



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

TESIS DOCTORAL

Mención Doctorado internacional

Jesús Gómez Escudero

*PKM2 regula la angiogénesis mediante
la producción de ATP de forma local
en células endoteliales.*

15 de Septiembre de 2017

DOCTORA DÑA. MARÍA JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, elaborado por Jesús Gómez Escudero para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título “PKM2 regula la angiogénesis mediante la producción de ATP de forma local en células endoteliales”, ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. Dña. Alicia García Arroyo, en el Área de Fisiopatología Vascul ar de la “Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III” en Madrid, España, dentro del programa de doctorado “Fisiopatología celular y molecular y sus implicaciones farmacológicas” de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado, en Salamanca, a 14 de Julio de 2017.

Dra. Dña. María Jesús Monte Río

LA DOCTORA ALICIA GARCÍA ARROYO, JEFA DE GRUPO E INVESTIGADORA PRINCIPAL DE LA “FUNDACIÓN CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES CARLOS III” DE MADRID, ESPAÑA,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, elaborado por Jesús Gómez Escudero para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título “PKM2 regula la angiogénesis mediante la producción de ATP de forma local en células endoteliales”, ha sido realizado bajo su dirección en el Área de Fisiopatología Vascular de la “Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III” en Madrid, España, dentro del programa de doctorado “Fisiopatología celular y molecular y sus implicaciones farmacológicas” de la Universidad de Salamanca, y considerando que cumple las condiciones necesarias, lo considera finalizado y autoriza su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente..

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado, en Madrid, a 13 de Julio de 2017.

Dra. Dña. Alicia García Arroyo

Este trabajo ha sido realizado gracias a la ayuda de mucha gente. En primer lugar la Dra. Alicia García Arroyo por toda su supervisión y ayuda. Gracias a los compañeros y ex-compañeros del laboratorio AGA del CNIC: Vane, Pilar, Ángela, Laura, Aga, Mara, Susana, Cris, Sergio, Magda, Xenia, Ángel, Álvaro, Richi, Diego, Bea y CSC.

Agradezco también a los compañeros de nuestros grupos vecinos de ala, MAP, JMR y PMC. Gracias a los compañeros de la unidad de microscopía, y demás unidades del CNIC. A Eduardo y a Laura Grau. A los compañeros de mantenimiento y de seguridad. A los trabajadores de la cafetería, en especial al señor Maestro. Y finalmente a todos los demás compañeros del CNIC que alguna vez habéis sido de gran ayuda o habéis participado como Rebeca Acín.

A Diego del laboratorio de Jaime Millán en el CBM.

A Peter Carmeliet, Katrien de Bock, Koen y demás miembros del laboratorio de “Metabolismo en angiogénesis tumoral “de Leuven.

A mis compañeros de Salamanca, Alicia, Miguel, Clau, Ele, Lu, Jose, Laura, Vic, Parri.

Mis amigos y amigas, y mis compañeros del futbol sala.

A mi bici y al señor Facundo, que hacen la vida más sencilla.

Padres, Luni y demás miembros de mi familia.

Y finalmente gracias Patri, y gracias a ti, Rock N' Roll.

Lo mejor aún está por llegar...

Summary

Angiogenesis is the formation of new blood vessels from pre-existing ones. This process begins with the reception by the endothelial cells of a stimulus that triggers the angiogenic response. For that purpose, one endothelial cell, called tip cell, is activated and begins to migrate in direction of the stimulus, with the other cells (stalk cells) of the vessel following it. Several cell mechanisms are implicated at this initial step, as the reorganization of endothelial junctions, the migration of the tip cell by generating cytoskeletal protrusions called filopodias, and the proliferation of the stalk cells. The impairment of these processes avoid a suitable angiogenesis process.

The activation of the endothelial cells induces an increase of the metabolism that is crucial, as its inhibition blocks angiogenesis. Glycolysis is the main metabolic pathway to obtain energy by the synthesis of ATP in the endothelial cells, and has several steps that regulate the flux to allow the production of energy, and to provide the other metabolic pathways with intermediate metabolites of the glycolysis. Moreover, all the cell mechanisms that allow the growth of the new vessel (endothelial cell junction, migration and proliferation) need an efficient support of ATP to work efficiently.

Cell metabolism is not homogenous as several enzymes can be compartmentalized in order to function in a more effective way, as the diffusion of ATP through the cell is not fast enough to provide energy for processes that occur in specific places of the cell. Local ATP production can regulate endothelial cell dynamics, the establishment of new cell-contacts, the movement of vesicles through cytoskeletal structures, or the reorganization of the cytoskeleton.

PKM2 is a key regulatory enzyme that catalyzes the last step of the glycolysis. It is a protein with a great implication in several pathologies as cancer or inflammation. For this reason it has been investigated mainly in cancer cells, but there are however scarce studies in endothelial cells or angiogenesis. PKM2 has two conformations, one more active and other more inactive, and thus it can regulate the flux of the glycolysis to allow the production of ATP or the synthesis of macromolecules for the proliferation of the cells.

We found that PKM2 is important for angiogenesis as in spheroid sprouting assays the interference of its expression by a siRNA reduces the number and the length of the new vessel structures. Analyzing the phenotype of the interference in endothelial cells in culture, we obtained that PKM2 regulates the migration and the endothelial cell junction dynamics. Indeed the regulation of the barrier function of the endothelial cells was compromised by the interference of PKM2. In contrast, PKM2 expression is dispensable for the proliferation in endothelial cells.

A pool of PKM2 localizes at endothelial cell junction, and also at the lamellipodias of migrating cells in culture. We checked the localization in the sprout assay, and confirmed that PKM2 is located at endothelial junction and also at the filopodias.

As PKM2 is an enzyme, we study the metabolism state of the interfered cells. The ECAR values that reflect the glycolysis flux was affected, but not the oxygen consumption, reflecting that the function of the mitochondria remained intact. We analyzed the pyruvate kinase activity in cytosolic and in cytoskeletal-membrane fraction, and we discovered that the activity was higher in the cytoskeletal-membrane than in the cytosol. This fact can explain that the proliferation was not affected by PKM2, as the lower activity in the cytosol may allow the accumulation of intermediate metabolites of the glycolysis that provide of substrates for the proliferation, while in the other places is more active, generating ATP for regulating other processes. Indeed we found that the levels of ATP were lower at the cytoskeletal-membrane fraction in endothelial cells by biochemistry and also by the observation of a fluorescence construction, GO-aTeam1, which allows the quantification of ATP at subcellular levels.

To test the hypothesis that the activity of PKM2 is the responsible of the phenotype, we used an inhibitor of PKM2, shikonin. We found that the migration and the endothelial cells dynamics were affected, but not the proliferation, in cells in culture, and also in the spheroid sprouting assay.

Finally we analyzed the impact of reducing PKM2 in the vascular development in the postnatal mouse retina, by the intravitreal injection of siRNA or with shikonin. We found that the radial vascular growth was reduced in both conditions. The number of filopodia and the endothelial junction dynamics were also affected, but not the number of endothelial cells or the vascular density, reflecting that the proliferation was not compromised.

We described the role of PKM2 in angiogenesis, regulating endothelial junctions and cytoskeletal dynamics by local ATP production. Due to the importance of PKM2 in pathologies such as cancer, we provided new features to take in account to develop new strategies for improvement of treatments for these diseases.

Índice

Introducción	1
1. El Sistema Circulatorio y el Endotelio.	3
1.1. Estructura y composición.	3
1.2. El endotelio	4
2. Formación de vasos sanguíneos: Angiogénesis	5
2.1. Tipos de formación de vasos sanguíneos	5
2.2. La Respuesta angiogénica	7
2.3. El proceso de angiogénesis.	8
2.3.1. Selección de la célula de la punta y de las células del tallo.	8
2.3.2. Formación del lumen y maduración del vaso	11
3. Uniones Endoteliales	12
3.1. Tipos de uniones endoteliales	13
3.1.1. Uniones estrechas	14
3.1.2. Uniones adherentes.	14
3.1.2.1. Cadherinas	15
3.1.2.2. Cateninas	15
3.2. Ensamblaje de las uniones adherentes	16
3.3. Maduración de las uniones endoteliales: cambios morfológicos del patrón de Ve-cadherina	18
3.4. Mecanismos que regulan la función de Ve-cadherina en la barrera endotelial. 20	
3.4.1. Tráfico de Ve-cadherina.	20
3.4.2. Fosforilación de Ve-cadherina.	21
3.4.3. Alteraciones del citoesqueleto	23
3.5. Función de las uniones endoteliales en angiogénesis.	24
4. Metabolismo Endotelial	27
4.1. Rutas metabólicas en el endotelio.	27

4.2. Metabolismo endotelial en angiogénesis.	29
4.3. Compartimentalización del metabolismo.	32
5. Piruvato Quinasa M2 (PKM2)	34
5.1. Expresión de las diferentes isoformas de piruvato quinasa.	34
5.2. Estructura de PKM2.	36
5.3. Regulación de la actividad de PKM2.	37
5.3.1. Regulación alostérica de PKM2.	38
5.3.2. Regulación por modificaciones postraduccionales.	39
5.4. Funciones no canónicas de PKM2.	40
5.5. Compartimentalización de PKM2	40
5.6. PKM2 en patologías.	41
5.6.1. Cáncer.	41
5.6.2. Otras patologías.	42
5.7. PKM2 en el endotelio.	43
Objetivos	47
Materiales y Métodos	53
1. Tipos Celulares	55
1.1. Células endoteliales.	55
1.2. Fibroblastos.	55
2. Métodos de biología celular.	56
2.1. Tratamientos celulares	56
2.2. Silenciamiento de la expresión de proteínas mediante ARN de interferencia. .	56
2.3. Transfección de plásmidos.	57
2.4. Transducción con lentivirus.	58

3. Ensayos “in vitro”	59
3.1. Ensayo de migración mediante cierre de heridas en monocapas de HUVECs.	59
3.2. Ensayos de proliferación celular.	60
3.2.1. <i>Recuento directo del número de células.</i>	60
3.2.2. <i>Cuantificación de células positivas para Ki67.</i>	60
3.3. Ensayos de formación de estructuras tipo capilares en geles de fibrina.	60
3.3.1. <i>Ensayos con esferoides formados por células.</i>	60
3.4. Ensayos con esferoides recubiertos por células.	61
3.5. Análisis de la integridad de la barrera endotelial. Resistencia eléctrica transendotelial.	62
4. Ensayos in vivo: Desarrollo vascular en retinas de ratones en neonatos.	63
4.1. Inyección intravitreal	63
4.2. Aislamiento de las retinas.....	64
5. Técnicas de microscopia de fluorescencia.	64
5.1. Tinciones de inmunofluorescencia.....	64
5.1.1. <i>En células.</i>	64
5.1.2. <i>En geles de fibrina.</i>	65
5.1.3. <i>En retinas de ratones.</i>	66
5.2. Microscopia de célula viva.	66
6. Técnicas Bioquímicas	67
6.1. Subfraccionamiento de membranas de células endoteliales.	67
6.2. Análisis de la expresión de proteínas mediante Western Blot.	68
6.2.1. <i>Extracción y cuantificación de proteínas.</i>	68
6.2.2. <i>Electroforesis y transferencia.</i>	69
6.2.3. <i>Bloqueo, incubación y revelado.</i>	69
7. Técnicas metabólicas.	70
7.1. Medidas del flujo de la glucólisis por acidificación del medio de cultivo.....	70

7.2. Medida de la actividad de la mitocondria mediante el consumo de oxígeno celular.....	71
7.3. Medida de ATP.....	72
7.3.1. ATP en fracciones celulares.....	72
7.3.2. Visualización de ATP a nivel subcelular.....	72
7.3.3. Medida de la actividad de la piruvato quinasa.....	73
8. Técnicas de análisis de imagen.....	73
8.1. Análisis en células en monocapa.....	73
8.2. Intensidad media de fluorescencia.....	73
8.3. Análisis de las morfologías de uniones endoteliales.....	74
8.4. Análisis en ensayos in vitro de angiogénesis.....	74
8.4.1. Longitud y número de capilares.....	74
8.4.2. Número de filopodias.....	75
8.5. Análisis en retinas.....	75
8.5.1. Crecimiento radial.....	75
8.5.2. Densidad vascular.....	75
8.5.3. Número de células endoteliales por área vascular.....	75
8.5.4. Número de filopodias.....	76
9. Análisis estadístico.....	77
10. Anticuerpos y tinciones utilizados.....	78
Resultados.....	83
1. Caracterización de la expresión de isoformas de piruvato quinasa en células endoteliales.....	85
2. Regulación de los parámetros celulares que regulan la angiogénesis por parte de PKM2.....	86

2.1. Análisis de la proliferación de células endoteliales.....	86
2.1.1. Análisis de la expresión de PKM2 durante los días de cultivo.	86
2.1.2. Estudio del número de células en cultivo a lo largo de los días.....	87
2.1.3. Análisis de la proliferación mediante el marcador de proliferación Ki67.	88
2.2. Estudio de la función de PKM2 en la regulación de la capacidad migratoria de las células endoteliales.	90
2.3. Estudio del papel de PKM2 en la regulación de uniones endoteliales.	93
2.3.1. En células confluentes en condiciones basales.....	93
2.3.2. En condiciones de remodelado de uniones.	95
2.3.3. Análisis de otros marcadores de uniones endoteliales adherentes.....	96
2.3.4. Estudio de la función de PKM2 en la integridad de la barrera endotelial.....	98
2.3.5. Estudio de las uniones endoteliales en el ensayo de migración por cierre de herida en células interferidas para PKM2.	100
2.3.5.1. Análisis de la morfología de las uniones endoteliales.	100
2.3.5.2. Análisis de la orientación de las células endoteliales durante la migración colectiva.	102
2.4. Estudio de la función de PKM2 en la formación de estructuras tipo capilares in vitro.....	104
2.4.1. Formación de estructuras tipo capilares en esferoides de HUVECs embebidos en geles de fibrina.....	104
2.4.2. Formación de estructuras tipo capilares en microesferas recubiertas de HUVECs embebidas en geles de fibrina.	106
2.4.3. Análisis de la proliferación celular en el modelo esferoides recubiertos de HUVECs..	109
2.4.4. Análisis de la formación de filopodias en las estructuras tubulares de esferoides recubiertos de HUVECs embebidos en geles de fibrina.....	110
2.4.5. Análisis de la formación de lumen en las estructuras tipo capilares.	111
2.4.6. Análisis de la complejidad de las uniones endoteliales mediante el algoritmo de patrones de morfología de Ve-cadherina.	112
3. Localización de PKM2 en células endoteliales.	114
3.1. Monocapas confluentes de células endoteliales	114
3.2. Monocapas de células endoteliales que se encuentran remodelando sus uniones endoteliales.	116
3.3. Análisis de las dinámicas de PKM2 en células endoteliales.....	118

3.4. Análisis de la localización de PKM2 en HUVECs mediante el subfraccionamiento celular de los diferentes compartimentos celulares.....	120
3.5. Localización de PKM2 en las células endoteliales en las estructuras tipo capilares.	123

4. Mecanismo de acción de PKM2 en la regulación de las funciones celulares endoteliales. 124

4.1. Función de PKM2 en el metabolismo endotelial.	124
4.2. Actividad de la piruvato quinasa	125
4.3. Niveles de ATP en células endoteliales interferidas para PKM2.....	128
4.4. Análisis del efecto de la inhibición de la actividad de PKM2 en los parámetros celulares endoteliales.	131
4.4.1. <i>Análisis del efecto de la inhibición de la actividad de PKM2 en células en cultivo.</i> ..	131
4.4.1.1. <i>Estudio de la proliferación y la migración.</i>	131
4.4.1.2. <i>Análisis de la función de la actividad de PKM2 en la regulación de las dinámicas de las uniones endoteliales.</i>	132
4.4.2. <i>Estudio de la inhibición de la actividad de PKM2 en los ensayos de angiogénesis in vitro.</i>	134
4.5. Análisis de los parámetros celulares endoteliales con un inhibidor global de la glucólisis.136	
4.5.1. <i>Estudio de la proliferación de células tratadas con el inhibidor de la glucólisis 2-DG.</i> 136	
4.5.2. <i>Estudio de la migración en células tratadas con el inhibidor de la glucólisis 2-DG.</i> ..	137
4.5.3. <i>Estudio de las uniones endoteliales en células tratadas con el inhibidor de la glucólisis 2-DG.</i>	138

5. Papel de PKM2 en la angiogénesis in vivo. 139

5.1. Interferencia de PKM2 en el modelo de desarrollo vascular en la retina neonatal de ratones.....	139
5.1.1. <i>Estudio de parámetros vasculares en las retinas interferidas para PKM2.</i>	141
5.1.2. <i>Estudio de los filopodias en los vasos sanguíneos de retinas interferidas para PKM2.</i> 142	
5.1.3. <i>Estudio de la morfología de las uniones endoteliales en los vasos sanguíneos de retinas interferidas para PKM2.</i>	143

5.2. Estudio de la inhibición de la actividad de PKM2 en el modelo de desarrollo vascular en la retina neonatal de ratones.....	145
5.2.1. Estudio de los parámetros vasculares en los vasos sanguíneos de retinas de ojos inyectados intravítreamente con shikonina.	145
5.2.2. Estudio de los filopodias en los vasos sanguíneos de retinas de ojos inyectados intravítreamente con shikonina.	147
5.2.3. Estudio de las uniones endoteliales en los vasos sanguíneos de retinas de ojos inyectados intravítreamente con shikonina.	147

Discusión..... 153

1. Expresión de PKM2 en células endoteliales.	155
2. La expresión y actividad de PKM2 no influye en la proliferación de las células endoteliales.....	158
3. PKM2 en la regulación de la migración de las células endoteliales.....	160
4. PKM2 en la regulación de las uniones endoteliales.	163
5. Discusión final: PKM2 en angiogénesis.	169

Conclusiones 173

Bibliografía 181

Índice de Figuras

Introducción

Figura 1. Tipo de vasos sanguíneos

Figura 2. Ejemplos de tipo de formación de vasos sanguíneos.

Figura 3. Modelo de inhibición lateral DLL4-Notch.

Figura 4. Mecanismos que regulan la formación del vaso naciente.

Figura 5. Tipos de complejos de uniones en células endoteliales y sus componentes.

Figura 6. Tipos de patrones de unión de Ve-cadherina.

Figura 7. Tráfico de Ve-cadherina.

Figura 8. Rutas metabólicas endoteliales.

Figura 9. Esquema de la expresión del procesamiento alternativo de las dos isoformas de PKM.

Figura 10. Estructura de PKM2.

Figura 11. Regulación de la actividad y conformación de PKM2.

Resultados

Figura 12. PKM2 es la isoforma expresada preferentemente en HUVECs.

Figura 13. La expresión de PKM2 y PKM1 no varía a lo largo de los días de cultivo.

Figura 14. La expresión de PKM2 no influye en la proliferación de células endoteliales.

Figura 15. El porcentaje de células positivas para Ki67 no cambia con la interferencia de PKM2.

Figura 16. La interferencia de PKM2 provoca defectos en la migración de células endoteliales.

Figura 17. El porcentaje de células Ki67+ no varía en el ensayo de cierre de herida con la interferencia de PKM2.

Figura 18. Los defectos en proliferación se mantienen aunque la proliferación de las células endoteliales sea inhibida.

Figura 19. La interferencia de PKM2 afecta a la intensidad en la unión y al patrón de Ve-cadherina en condiciones basales.

Figura 20. La interferencia de PKM2 afecta a la intensidad y patrón de Ve-cadherina cuando las uniones se remodelan.

Figura 21. La intensidad de γ -catenina disminuye con la interferencia de PKM2.

Figura 22. La expresión de PKM2 afecta a la regulación de la barrera endotelial.

Figura 23. Las células interferidas para PKM2 presentan defectos en la morfología de la unión cuando están migrando.

Figura 24. El patrón de morfología de Ve-cadherina en células interferidas para PKM2 se encuentra desplazado hacia las uniones activas.

Figura 25. Las células interferidas para PKM2 se orientan de forma equivocada en la migración colectiva.

Figura 26. La interferencia de PKM2 disminuye el número y longitud de las estructuras tipo capilares en el ensayo de esferoides.

Figura 27. Las microesferas recubiertas de HUVECs interferidas para PKM2 producen menos estructuras tipo capilares y de menor longitud.

Figura 28. La interferencia de PKM2 se mantiene al final del ensayo en las microesferas.

Figura 29. La expresión de PKM2 no varía el porcentaje de células proliferando en las células de las estructuras tubulares de las microesferas.

Figura 30. La interferencia de PKM2 produce que haya menos filopodia en las células de la punta de las microesferas.

Figura 31. Las estructuras de las microesferas de células interferidas para PKM2 forman un lumen bien estructurado.

Figura 32. El patrón de clasificación de morfología de uniones endoteliales está desplazado hacia uniones activas en las estructuras tubulares de microesferas formadas por células interferidas para PKM2.

Figura 33. Una porción de PKM2 se localiza en las uniones endoteliales células endoteliales en confluencia.

Figura 34. PKM2 se localiza junto a la F-actina que está asociada a uniones en células endoteliales en confluencia.

Figura 35. PKM2 se localiza en las uniones endoteliales en células endoteliales que han sido estimuladas para que se remodelen las uniones endoteliales.

Figura 36. PKM2 se localiza en los lamelipodias en células endoteliales que migran.

Figura 37. PKM2-GFP presenta una gran dinámica en regiones de uniones endoteliales que se remodelan.

Figura 38. PKM2-GFP se localiza en las mismas regiones que otras proteínas de uniones endoteliales en HUVECs.

Figura 39. Expresión citosólica y membranal de PKM2.

Figura 40. Expresión de PKM2 en la membrana plasmática en células endoteliales.

Figura 41. Localización de PKM2 en las uniones y en los filopodia de estructuras tubulares de los ensayos de angiogénesis in vitro.

Figura 42. La interferencia de PKM2 reduce el metabolismo de la glucosa pero no afecta al metabolismo mitocondrial.

Figura 43. La permeabilización con saponina permite extraer fracciones citosólica y citoesqueléticas/membranales proteicas de células endoteliales.

Figura 44. La actividad de la piruvato quinasa es mayor en la fracción citoesquelética-membranal, y en células endoteliales interferidas para PKM2 se encuentra reducida en ambas fracciones.

Figura 45. Los niveles de ATP en células endoteliales interferidas para PKM2 están reducidos.

Figura 46. Los efectos de la interferencia de PKM2 en proliferación y migración, se reproducen con el tratamiento con shikonina.

Figura 47. La inhibición de actividad de PKM2 provoca defectos en las uniones endoteliales.

Figura 48. La inhibición de PKM2 reduce la formación de estructuras tipo capilares en esferoides de células tratadas con Shikonina, embebidas en geles de fibrina.

Figura 49. La inhibición de PKM2 reduce la formación de estructuras tipo capilares en esferoides recubiertos de células tratadas con Shikonina, embebidas en geles de fibrina.

Figura 50. La inhibición de la glucólisis con 2-DG reduce la proliferación de las células endoteliales.

Figura 51. La inhibición de la glucólisis con 2-DG reduce la migración de células endoteliales

Figura 52. La inhibición de la glucólisis con 2-DG afecta a las uniones endoteliales.

Figura 53. La interferencia de PKM2 en retinas de ratones neonatos a día 6 reduce la expresión de PKM2.

Figura 54. El crecimiento radial vascular de las retinas interferidas para PKM2 es menor, pero la complejidad vascular no varía.

Figura 55. Reducido número de filopodia de las células endoteliales en retinas interferidas para PKM2.

Figura 56. El patrón de morfología de Ve-cadherina en vasos sanguíneos de retinas interferidas para PKM2 refleja un aumento de uniones activas.

Figura 57. El crecimiento radial vascular de las retinas tratadas con shikonina es menor.

Figura 58. Reducido número de filopodias de las células endoteliales en retinas tratadas con shikonina.

Figura 59. El patrón de morfología de Ve-cadherina en vasos sanguíneos de retinas tratadas con shikonina refleja un aumento de uniones activas

Índice de tablas

Introducción

Tabla 1. Moléculas reguladoras alostéricas de la actividad de PKM2.

Métodos

Tabla 2. Secuencias ARNi.

Tabla 3. Plásmidos utilizados.

Tabla 4. Lentivirus utilizados.

Tabla 5. Longitudes de onda de fluorescencia en microscopia de célula viva.

Tabla 6. Anticuerpos y tinciones utilizados.

Introducción

1. El Sistema Circulatorio y el Endotelio.

1.1. Estructura y composición.

Nuestro sistema circulatorio consiste en estructuras que permiten el movimiento de los fluidos a lo largo del organismo. Así, los nutrientes son transportados a los órganos que los necesitan, las hormonas alcanzan sus dianas, los productos de deshecho son recogidos, se regula la temperatura, y se ejerce la función de defensa contra patógenos y otros daños contra el organismo.

En el ser humano, el sistema circulatorio está compuesto por un órgano muscular que bombea la sangre, el corazón, y por un conjunto de vasos que transportan la sangre (Monahan-Earley et al, 2013). Estos se dividen entre arteriales y venosos dependiendo del sentido de la circulación. Así, los vasos arteriales son los encargados de transportar la sangre desde el corazón a los diversos órganos, mientras que los vasos venosos son los que realizan el transporte en el sentido contrario de regreso al corazón. Diversos mecanismos regulan el destino de los vasos sanguíneos durante el desarrollo, es decir si se diferenciaran a vaso arterial o venoso (Swift and Weinstein, 2009). Además, existen otro tipo de vasos, los linfáticos, que realizan funciones de defensa, y también recogen el exceso de líquido del organismo (Liao and von der Weid, 2014).

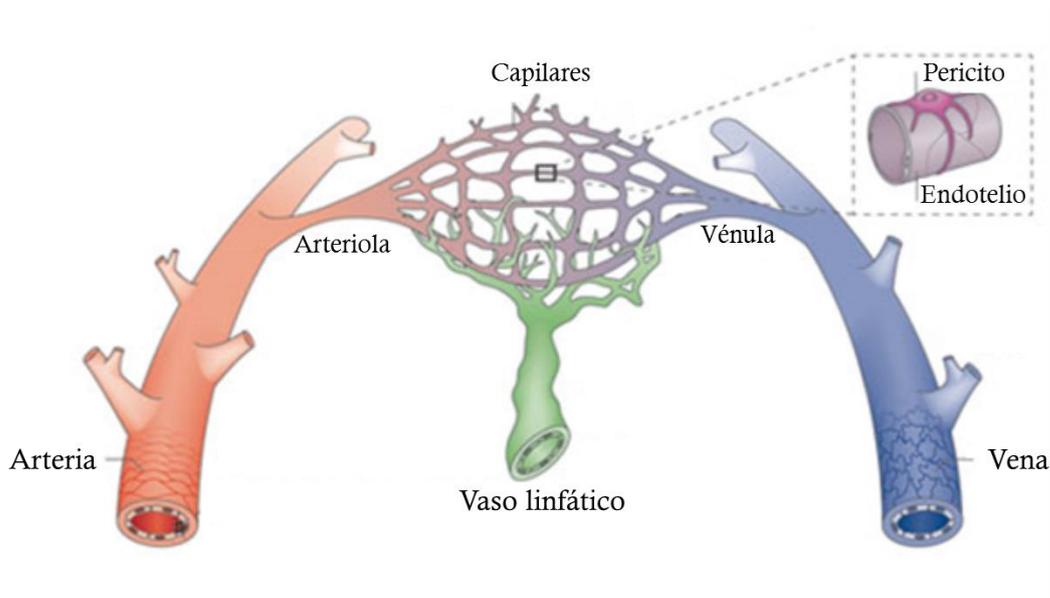


Figura 1. Tipo de vasos sanguíneos. Adaptado de Herbert and Stainier, 2011

Los vasos sanguíneos se clasifican además atendiendo a su grosor y tamaño. Las arterias y venas de gran tamaño van ramificándose y reduciendo su anchura denominándose arteriolas y vénulas, para finalmente formar los capilares arteriales y venosos, que son los vasos que realizan el intercambio de nutrientes directamente con el resto de tejidos del organismo.

El grosor de los vasos sanguíneos viene determinado por el número de capas de células y matriz de los que están formados. La complejidad y volumen de estas capas en los grandes vasos, que cuentan con músculo liso vascular, capas elásticas, fibroblastos, matriz extracelular... va disminuyendo a medida que se va reduciendo el grosor de los vasos hasta llegar a los capilares. Estos únicamente cuentan con la capa de células que está en contacto con la sangre, denominada endotelio, formado por células endoteliales. Los capilares además están compuestos por la membrana basal que les separa de otros tipos de tejidos y, en determinados órganos, de un tipo celular que rodea y se asocia con el endotelio, los pericitos (Jain, 2003) (Figura 1).

1.2. El endotelio

Como hemos apuntado en el apartado anterior, el endotelio es la capa celular que está en contacto con la sangre, recubriendo el interior de los vasos. A pesar de que durante mucho tiempo se ha pensado que era una barrera pasiva que revestía y permitía el paso de sustancias a través de ella, la realidad es muy diferente. Se trata de una estructura con una gran actividad metabólica, un tejido clave que regula procesos fisiológicos importantes para el organismo, como la permeabilidad al paso de nutrientes desde la sangre al tejido, la regulación del tono vascular, la respuesta inflamatoria, el remodelado de los tejidos, los procesos inflamatorios y la hemostasia.

Debido a las características peculiares de cada órgano del cuerpo humano, las células endoteliales presentan una gran heterogeneidad en cuanto a su expresión génica, sus funciones, morfología y características. (Birau et al, 2012; March et al, 2009; Aird, 2012)

A pesar de las importantes funciones que realizan en homeostasis, las células endoteliales se encuentran normalmente en un estado que denominamos de quiescencia. Es solamente a partir de determinados estímulos, como consecuencia de que un tejido necesita un aporte extra de sangre, ya sea por procesos fisiológicos, como la mayor necesidad de aporte de nutrientes durante el crecimiento o al hacer deporte, como por un proceso inflamatorio o tumoral, que las células endoteliales se activan, comenzando el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos, denominado angiogénesis (Bloor, 2005; Jain and Carmeliet, 2011).

2. Formación de vasos sanguíneos: Angiogénesis.

2.1. Tipos de formación de vasos sanguíneos

Durante el desarrollo embrionario, el proceso de estructuración de nuevos vasos sanguíneos a partir de células embrionarias progenitoras endoteliales se denomina vasculogénesis, cuyo producto final es el plexo vascular primario (Carmeliet, 2000). Además de en el desarrollo embrionario, este proceso puede darse de forma similar en procesos patológicos. Así, los tumores son capaces de captar células progenitoras endoteliales, que darán lugar a un entramado de vasos sanguíneos que les proveerán de nutrientes (Carmeliet and Jain, 2011).

Cuando este proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos se produce a partir de vasos preexistentes mediante brotes que surgen de ellos, como ocurre en la formación del plexo maduro en el embrión, o más adelante en el organismo adulto, se denomina angiogénesis de brote capilar. Así, durante este proceso, las células endoteliales de un vaso se activan y comienzan a migrar a través del tejido, formando una nueva estructura vascular conectada con la que existía previamente. (Hillen and Griffioen, 2007) (Figura 2 izq.).

Aunque la angiogénesis de brote capilar es el proceso más común y también el más estudiado, existen otros tipos de angiogénesis, como la intususcepción. En la

intususcepción, se produce la duplicación de un vaso sanguíneo gracias a la formación de unos pilares intraluminales, que van uniéndose formando un septo, y finalmente producen la separación del lumen, dividiéndose el vaso en dos. Es un proceso característico en el desarrollo alveolar del pulmón, o en el colon, en el que se produce en respuesta a algún proceso inflamatorio, como la colitis (Konerding et al, 2010; Mentzer and Konerding, 2014) (Figura 2 centro).

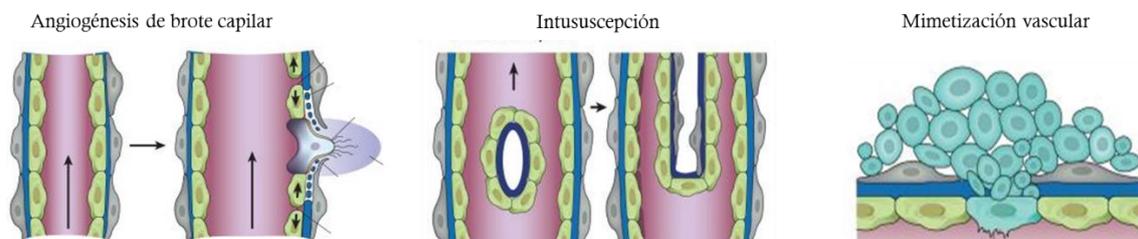


Figura 2. Ejemplos de tipo de formación de vasos sanguíneos. Esquemas de angiogénesis de brote capilar (izquierda), intususcepción (centro) y mimetización vascular en tumores (derecha). Adaptado de Carmeliet and Jain, 2011.

Otro proceso descrito de formación de vasos es la “mimetización vascular”, la cual se da en ciertos tumores. Células tumorales desdiferenciadas pueden presentar características endoteliales y asociarse para formar una segunda vasculatura de la que el tumor se sirve (Carmeliet and Jain, 2011) (Figura 2 derecha.).

Como se ha indicado anteriormente, además de las arterias y venas, también existen otro tipo de vasos sanguíneos, los vasos linfáticos. El proceso de formación de estos vasos, denominado linfoangiogénesis, comparte ciertas características con la angiogénesis, pero contiene otros mecanismos específicos y otros tipos de moléculas y receptores. Es un proceso importante que tiene que estar fuertemente regulado, ya que tanto si da de forma deficiente o exagerada, puede agravar patologías como la inflamación o el cáncer. (Aebischer al, 2014; Wong et al, 2017).

2.2. La Respuesta angiogénica.

Hay diversos estímulos que pueden desencadenar la angiogénesis, como la falta de oxígeno o nutrientes, cambios en el flujo sanguíneo, inflamación... Sin embargo, muchos de sus mecanismos son comunes. Al generarse uno de estos estímulos en un tejido, se secretan moléculas que provocan la producción de factores de crecimiento que activan los vasos sanguíneos. Por ejemplo, cuando se produce falta de oxígeno en un tejido, se sintetizan los factores de respuesta a hipoxia, como el factor inducible por hipoxia 1- α o HIF1- α . La presencia de este factor produce la expresión de ciertos genes en las células de ese tejido. Entre ellos se encuentran los pertenecientes a factores de crecimiento, uno de los cuales es VEGF-A (Factor de crecimiento del endotelio vascular-A), el cual es secretado desde las células del tejido. Desde estas células del tejido se forma un gradiente de este factor en dirección a las zonas circundantes en las que se encuentran los vasos sanguíneos.

Las células endoteliales tienen receptores para la unión de esos factores de crecimiento localizados en su membrana plasmática. Así VEGF-A interacciona con su receptor, y se produce una cascada de señalización en la que la célula endotelial se activa y comienza a migrar seguida del resto de células en dirección al gradiente de VEGF-A, formando un nuevo vaso sanguíneo. Este vaso sanguíneo avanza en dirección al tejido que está emitiendo el factor de crecimiento endotelial, hasta que lo alcanza y se corrige la demanda de nutrientes (Carmeliet and Jain, 2011).

Además de VEGF-A, existen otras moléculas que pueden desencadenar estas respuestas en las células endoteliales, como ocurre, por ejemplo, en la compensación angiogénica tumoral. Después de un período en el que se ha bloqueado la angiogénesis en un tumor, bloqueando la señal de VEGF-A, las células endoteliales son capaces de responder a otros factores de crecimiento. Entre ellos se encuentran el factor de crecimiento de fibroblastos-2 o FGF-2, angiopoietina 2 o el factor de crecimiento de hepatocitos (Gacche, 2015).

2.3. El proceso de angiogénesis.

2.3.1. Selección de la célula de la punta y de las células del tallo.

Como se ha comentado anteriormente, un capilar sanguíneo está formado por células endoteliales, los pericitos asociados a ellas y la membrana basal. Para que se produzca la iniciación del nuevo capilar y éste avance, los pericitos se despegan del vaso gracias a Angiopoietina 2, y la membrana basal es degradada por las metaloproteasas de las células endoteliales.

Sin embargo, antes debe decidirse cuál es la célula endotelial que se activará y guiará la formación del nuevo vaso, avanzando a través de la matriz y el tejido. Este mecanismo de selección ha sido estudiado durante los últimos años, y aunque aún hay aspectos y participantes que continúan apareciendo en sucesivos estudios, se ha establecido como modelo aceptado el sistema de selección por inhibición lateral DLL4-Notch, mediante el que diferencian dos tipos de células, la primera del nuevo vaso, que es denominada célula de la punta, y las que la siguen que se nombran células del tallo (Figura 3).

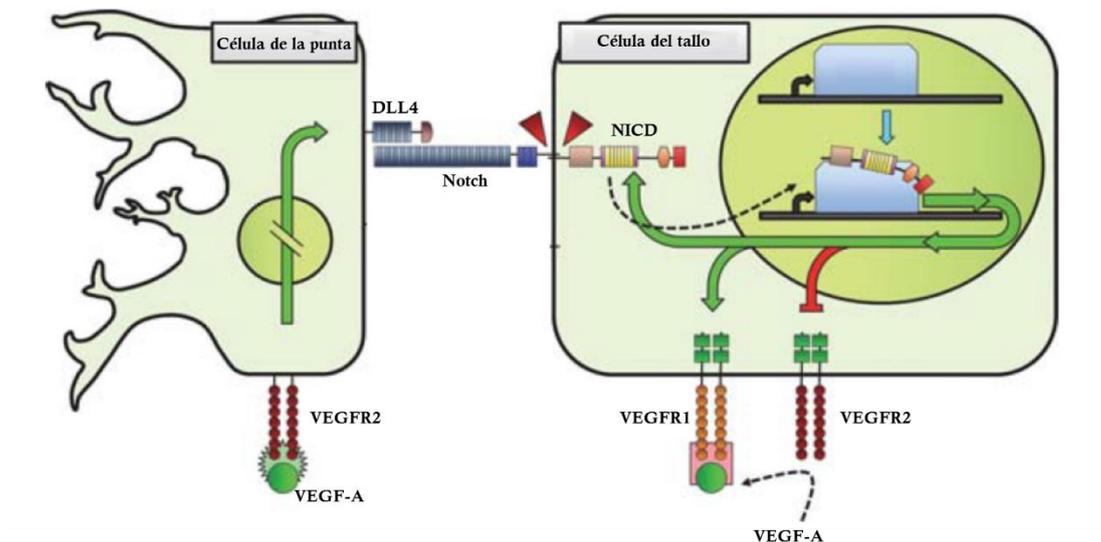


Figura 3. Modelo de inhibición lateral DLL4-Notch. Adaptado de Tung and Tattersall, 2012.

La unión de VEGF-A a VEGFR2 genera una cascada de señalización, que genera la expresión de varios genes, uno de los cuales es DLL4. Esta proteína es transportada a la membrana, exponiéndose al contacto con las células adyacentes. Así, DLL4 de la célula de la punta interacciona con una molécula de la célula adyacente, Notch. Esta interacción provoca el procesamiento proteolítico de Notch, el cual es mediado por una proteasa denominada γ -secretasa, de tal forma que la parte citosólica de Notch, NICD (Dominio intracelular de Notch), es liberada al citosol, y transportada al núcleo; donde provoca la represión de algunos genes, como el receptor VEGFR2, y la activación de otros, como VEGFR1. Este receptor, compite por la unión a VEGF-A, con lo que se inactiva de forma efectiva la señalización de VEGFR2 en las células del tallo (Hellstrom et al, 2007a; Tung and Tattersall, 2012), así como la generación de filopodias en las mismas células (Pelton et al, 2014).

Éstas son protrusiones de citoesqueleto estrechas, que son más abundantes en la célula de la punta, importantes para el contacto con otros tipos celulares, como astrocitos y macrófagos (Gerhardt et al, 2003). Además, participan en la anastomosis, o unión con otros vasos, ampliando así la complejidad de la red capilar (Lenard et al, 2013). Aunque está discutido su papel en la direccionalidad del movimiento de la célula, ya que otras protrusiones citoesqueléticas, como los lamelipodias, son capaces de establecer esa direccionalidad del movimiento, está ampliamente aceptado que incrementan la velocidad de movimiento de la célula en dirección al gradiente de VEGF (Phng et al, 2013). De hecho, ratones deficientes en otro receptor presente en las células de la punta, Neuropilin-1 (NRP-1), presentan defectos en el desarrollo vascular de las retinas postnatales, debido a defectos en la generación de los filopodias (Fantin et al, 2015). Las protrusiones, además, deben presentar características específicas en cuanto a su morfología y estructura, ya que en ratones deficientes en MAP4K se han descrito deficiencias en el desarrollo vascular en la retina postnatal, debido a que las protrusiones que se generan son demasiado elongadas. Cultivos de células endoteliales en las que se ha silenciado esa proteína presentan a su vez defectos en la migración, y si se corrige la longitud de estas estructuras, los defectos en angiogénesis se rescatan (Vitorino et al, 2015). Estos hallazgos, en concordancia con otros estudios (Hoang et al, 2011, Bayless and

Johnson, 2011), ponen en evidencia la importancia de regulación de la dinámica del citoesqueleto en la angiogénesis.

Otro de los cambios que se produce como consecuencia de la activación de la célula de la punta, es la remodelación de las uniones celulares que mantienen cohesionada la recién activada “célula de la punta” con las células adyacentes a ella, evitando así la extravasación de sangre del capilar (Carmeliet and Jain 2011). La relevancia del papel de las uniones endoteliales en angiogénesis será tratado más adelante en mayor profundidad.

La especialización de las células del vaso naciente para que sean uno u otro de estos dos tipos celulares especiales, conduce a que tengan diferentes funciones. Mientras que la célula de la punta dirige y genera el avance del vaso mediante su migración, las células del tallo se encargan de expandir el vaso, mediante la división de celular de forma controlada, aumentando el número de células que forman la nueva estructura (Gerhardt et al, 2003), ya que una proliferación excesiva genera defectos en la expansión de los vasos sanguíneos (Serra et al, 2015). Sin embargo, no está suficientemente claro qué célula es la que provoca el avance del vaso naciente; es decir, si éste está generado por la migración de las células de la punta, que arrastran a las células del tallo, o si la proliferación de éstas es lo que hace avanzar a la célula de la punta, y por lo tanto, su única función sería regular de la dirección efectiva de crecimiento (Adams and Alitalo, 2007).

A pesar de que la célula de la punta ha sido comúnmente caracterizada como no proliferativa debido a la inhibición de la ruta de Notch (Hellstrom, 2007b), en ciertas circunstancias sí se produce su proliferación, como en la linfangiogénesis (Detry et al, 2011), o en otros organismos como el pez cebra (Aydogan et al, 2015). Existe, además, un modelo matemático de angiogénesis en el que se considera una pequeña probabilidad de que la célula de la punta proliferare (Qutub et al, 2009). En otro trabajo, realizado en estructuras vasculares nacientes a partir de explantes de músculo, la proliferación se encuentra restringida a las células de la punta. Parece ser que las propiedades asignadas a célula de la punta o célula del tallo puede que dependan del órgano donde se realice el estudio del proceso angiogénico, o de la naturaleza de la matriz que tengan que atravesar las células al migrar (Yana et al, 2007).

Recientemente se ha descrito que el destino de las células como célula de la punta o tallo no es definitivo, sino que hay una dinámica, mediante la cual hay un intercambio de forma continua entre células de la punta y del tallo. Así, una célula del tallo sustituye a la célula de la punta, adquiriendo su función, mientras que la célula de la punta se reconvierte en célula del tallo (Jakobsson et al, 2010). De hecho, durante el crecimiento del nuevo vaso se puede observar, durante la mayoría del tiempo, un solapamiento entre dos células de la punta, aunque una de ellas es la que conserva una identidad real como tal. Esto puede ser observado en fenómenos como el diferente número de filopodias que presentan las dos células (Pelton et al, 2014). Este proceso depende de la expresión dinámica de moléculas como VEGFR-2 o DLL4, y facilita un intercambio de células de la punta aproximadamente cada 3,7 horas (Jakobsson et al, 2010).

2.3.2. Formación del lumen y maduración del vaso

Durante la expansión del nuevo vaso sanguíneo, se va produciendo la formación del lumen para que el flujo de sangre lo atraviese una vez que esté completamente formado. Este proceso puede ocurrir por dos procedimientos, la invaginación de las membranas de las células endoteliales o la fusión de vacuolas intracelulares que finalmente se conectan, formando un lumen completo. Durante este proceso, la regulación de las uniones endoteliales es crucial (Davis et al, 2008; Strilic et al, 2009; Lammert and Axnick, 2012).

Finalmente se produce la maduración del vaso, en el que se estabiliza. En caso de que no se produjese esta maduración, la nueva estructura entraría en regresión y desaparecería. Para este proceso, es necesario el reclutamiento de células accesorias como los pericitos, que son atraídos por la secreción de PDGF-B por parte de las células endoteliales, formándose además la membrana basal (Gaengel et al, 2009; Logsdon et al, 2014).

Después de todo este apartado, podemos concluir que los procesos celulares que participan en la angiogénesis son: la migración de las células de la punta, mediado

por la dinámica de las protrusiones del citoesqueleto, la proliferación de las células, mayoritariamente de las células del tallo, y la regulación de la dinámica de las uniones endoteliales entre las células que forman el nuevo vaso, que trataremos en el siguiente apartado (Figura 4).

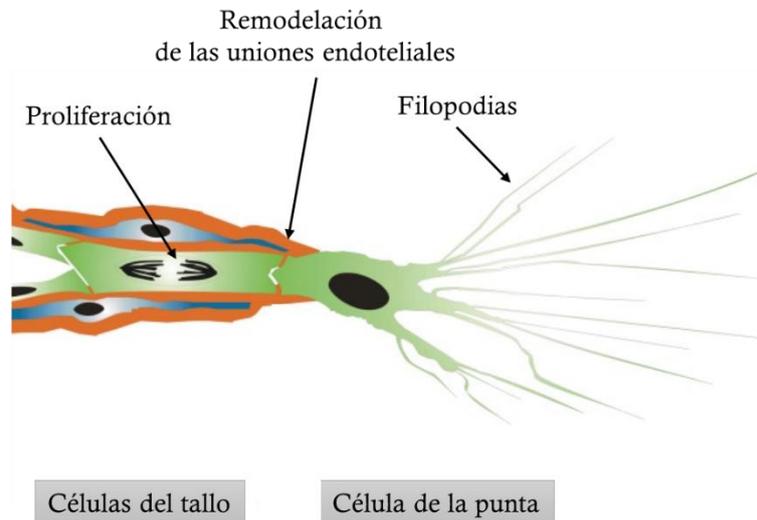


Figura 4. Mecanismos que regulan la formación del vaso naciente. Adaptado de Siemerink et al, 2013.

3. Uniones Endoteliales.

Las uniones entre células son estructuras especializadas de la superficie celular donde las membranas de células adyacentes conectan entre sí. Estas uniones están formadas por complejos de proteínas, muchos de los cuales interactúan con el citoesqueleto de actina, confiriendo así estabilidad mecánica a los diferentes tejidos (Lampugnani, 2012).

La función de las uniones no es meramente estructural, sino que participan en las cascadas de señalización al interior celular favoreciendo que las células intercambien señales de supervivencia, proliferación o de dónde y cómo están posicionadas.

De las estructuras de unión célula-célula más especializadas que se conocen, se encuentran las que componen el epitelio y el endotelio. Las uniones de estos tejidos

comparten muchos de los componentes que las forman, pero existen diferencias en su organización y en su dinámica de formación. Esto es debido en parte a que las uniones de células endoteliales están expuestas a diferentes tipos de flujo y a que cumplen una función imprescindible para la homeostasis, previenen el paso de elementos de la sangre hacia el tejido intersticial de manera incontrolada evitando edema y hemorragia, y controlando los procesos inflamatorios que podrían desencadenar. Pero a su vez, también deben permitir el paso de nutrientes y oxígeno a través de los capilares a los diferentes tejidos y órganos, así como regular el paso de leucocitos a las zonas de inflamación cuando es necesario (Bazzoni 2006).

3.1. Tipos de uniones endoteliales

Los principales complejos proteicos que integran la unión endotelial son las uniones estrechas (TJs) y las uniones adherentes (AJs). Aunque en células epiteliales las TJs y las AJs se encuentran separadas a lo largo de la unión, en las células endoteliales es común que proteínas que pertenecen a estos tipos de uniones se intercalen (Wallez and Huber, 2008).

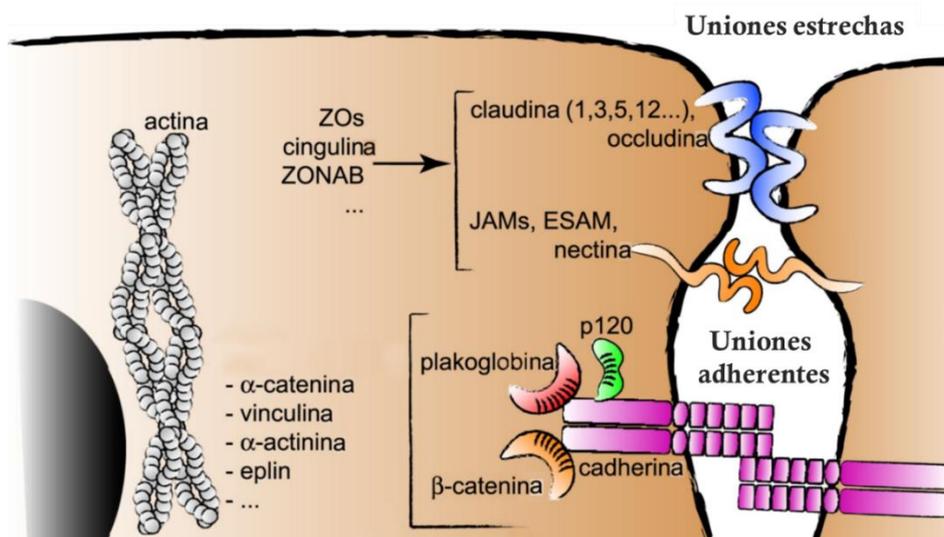


Figura 5. Tipos de complejos de uniones en células endoteliales y sus componentes. Adaptado de Dejana et al, 2009.

Estos complejos de proteínas están formados por proteínas transmembrana que funcionan como receptores de adhesión y proteínas que sirven de reguladores y de anclaje al citoesqueleto de actina, contribuyendo así al mantenimiento de la arquitectura celular (Figura 5).

3.1.1. Uniones estrechas

Las uniones estrechas fueron las primeras uniones descritas, definidas en un principio mediante microscopía electrónica como una especialización de la membrana plasmática que fue denominada *zonula occludens*. Su caracterización ha sido más exhaustiva en células epiteliales, ya que están claramente polarizadas, localizándose apicalmente en la unión, mientras que en células endoteliales no están bien definidas espacialmente. En el endotelio, la complejidad de estas uniones difiere dependiendo del tipo de vaso, la estructura de las TJs es más compleja en arterias y arteriolas que en venas y vénulas (Bazzoni and Dejana, 2004) y también difiere entre órganos. Por ejemplo, en la barrera hematoencefálica de los vasos cerebrales éstas estructuras están bien desarrolladas, no siendo así en otros órganos caracterizados por una mayor tasa de intercambio, como los pulmones (Simionescu et al, 1975).

Las proteínas transmembrana que forman las uniones estrechas son las claudinas (Morita et al, 2011; Dejana, 2004), la ocludina (Furuse et al, 1993), las moléculas adhesivas de la unión o JAMs (Moléculas de adhesión en la unión) (Bazzoni et al, 2000) y las proteínas ESAM (Molécula de adhesión específica de endotelio) (Nasdala et al, 2002). La principal proteína responsable de la unión con el citoesqueleto de actina es la proteína zonula occludens-1 (ZO-1) (Fanning et al, 1998; Stevenson et al, 1986).

3.1.2. Uniones adherentes.

Las uniones adherentes son el tipo de unión más extensamente estudiado, ya que son las primeras en reclutarse a los sitios de contacto entre células cuando la unión se está formando, desencadenando el reclutamiento del resto de componentes necesarios para que la unión sea funcional. Por otro lado estos complejos parecen ser

los responsables del dinamismo de las uniones endoteliales en respuesta a muchos de los agentes que afectan a la integridad de la barrera endotelial, transmitiendo señales de supervivencia, motilidad y polaridad al interior celular. Por último, las AJs son capaces de regular el ensamblaje o desensamblaje de las TJs (Taddei et al, 2008).

3.1.2.1. Cadherinas

Estas uniones están formadas por proteínas de la familia de las cadherinas, una superfamilia de glicoproteínas que median interacciones homofílicas dependientes de calcio. El principal componente en uniones adherentes de células endoteliales es la proteína Ve-cadherina (cadherina5), que es utilizado comúnmente como marcador específico de este tipo celular y está presente en el endotelio de cualquier tipo de vaso (Lampugnani et al, 1992). Recientemente también se ha descrito la expresión de Ve-cadherina en células tumorales que mimetizan a las células endoteliales formando una segunda vasculatura en tumores, proceso del que hemos descrito en el apartado anterior (Delgado-Bellido et al, 2017). En células endoteliales también se expresa N-cadherina (Clase I), pero de forma más difusa en membrana (Navarro et al, 1998), T-Cadherina (Rubin, 1992) y P-cadherina (Ivanov et al, 2001), dependiendo del tipo de endotelio, en los que se encuentran mediando contactos entre las células endoteliales con otras células como los pericitos o las células de músculo liso vascular (Gerhardt et al, 2003). Se ha descrito otra Ve-cadherina llamada Ve-cadherina-2 (Telo et al, 1998), que posee alta homología con las otras cadherinas excepto en la cola citoplasmática. Por sus características estructurales ha sido incluida en la familia de las protocadherinas (Frank and Kemler, 2002).

3.1.2.2. Cateninas.

Las cadherinas se asocian con el citoesqueleto a través de su interacción con otra familia de proteínas, las cateninas. Las cateninas son proteínas de la familia *armadillo*, de las cuales en el endotelio se expresan α -catenina, β -catenina, γ -catenina

y p120-catenina. El papel de las cateninas es importante, ya que estabilizan las uniones endoteliales, y además permiten la comunicación de las cadherinas con el citoesqueleto.

La relación entre cateninas es muy compleja, ya que, dependiendo de las circunstancias y de las proteínas con las que interaccionan, son capaces o no de unirse a otras. En términos de la comunicación entre cadherinas y citoesqueleto, γ -catenina y α -catenina son capaces de unirse directamente a la cola citosólica de la VE-cadherina, a la par que α -catenina puede unirse a su vez a actina (Vleminckx and Kemler, 1999, Ben-Ze'ev and Geiger, 1998). Además, otros estudios han demostrado que α -catenina no puede unirse directamente a filamentos de actina a la vez que a β -catenina (Drees et al, 2005) pero sí de manera indirecta ya que α -catenina interacciona también con las proteínas vinculina (Watabe-uchida, 1998), proteína homóloga de α -catenina (Herrenknecht et al, 1991), y α -actinina (Knudsen et al, 1995; Nieset et al, 1997), las cuales pueden unirse también a actina. Se ha demostrado que la proteína EPLIN (Proteína epitelial ausente en el neoplasma) puede mediar esta unión entre α -catenina y el citoesqueleto (Chervin-Pétinot et al, 2012).

Por su parte β -catenina y γ -catenina se unen al mismo dominio de la cola citosólica de la VE-cadherina y por lo tanto ambas podrían excluirse entre ellas (Prasain and Stevens, 2009). Ambas proteínas son también capaces de actuar en complejo con otras proteínas como factores de transcripción, cuando no están formando parte de la unión con VE-cadherina y no han sido degradadas en el citoplasma (Miravet et al, 2002; Ben-Ze'ev and Geiger, 1998; Hatsell and Cowin, 2001).

3.2. Ensamblaje de las uniones adherentes.

Las primeras etapas de la formación de las uniones son similares en diferentes tipos celulares, pero no así su maduración, ya que las células epiteliales y endoteliales requieren una adhesión polarizada más fuerte que por ejemplo neuronas y fibroblastos (Mege et al, 2006).

Según los estudios publicados, las proteínas que inician los contactos entre las células son las cadherinas, las cuales deben interaccionar entre sí de manera rápida y dinámica. Se ha demostrado que en células endoteliales existen acúmulos de Ve-cadherina que viajan a lo largo de los filopodias gracias a la proteína motor miosina X (Almagro 2010). De hecho, en células epiteliales se había sugerido que los contactos iniciales entre dos células que están migrando se producen a través de lamelipodias y filopodias (Mattila and Lappalainen, 2008). Por otro lado, trabajos realizados en queratinocitos primarios proponen que los complejos de unión se comienzan a establecer por interdigitación de filopodias, que establecerían una serie de contactos en forma de puntos que poco a poco se irían cerrando como una cremallera para formar una unión continua (Hoelzle and Svitkina, 2012).

Para que la adhesión quede establecida es necesaria la formación de homodímeros de cadherina formados en *trans*, es decir entre dos células adyacentes que se agrupan lateralmente con otras cadherinas formando dímeros en *cis* (Boggon et al, 2002; Patel et al, 2003; Wu et al, 2010). Las uniones así formadas sufren un reciclaje continuo de moléculas de cadherina, que parece depender de las diferentes conformaciones que pueden adquirir los dímeros formados por estas proteínas.

El citoesqueleto de actina y la tensión que éste ejerce sobre la membrana plasmática desempeñan un papel muy importante en el ensamblaje y organización de las uniones adherentes, y la actina unida a complejos de adhesión es esencial para mantener una barrera endotelial funcional (Dudek and Garcia, 2001; Lee and Gotlieb, 2002; Revenu et al, 2004).

Si la polimerización activa de actina ocurre localmente de manera exclusiva por el ensamblaje de las cadherinas, o si las uniones de cadherinas se forman en regiones donde ya existía una dinámica activa de actina, es un tema de discusión (Lambert et al, 2002). En un estudio reciente, se describió la formación de lamelipodias mediado por la proteína ARP2/3 (Complejo proteico 2/3 relacionado con actina) en zonas de la membrana entre dos células en las que Ve-cadherina se encuentra ausente. Así, se produce un rápido reclutamiento de Ve-cadherina donde se ha producido el solapamiento de membranas entre las dos células formándose la unión (Taha et al, 2014).

3.3. Maduración de las uniones endoteliales: cambios morfológicos del patrón de Ve-cadherina.

El estado de las uniones se puede diferenciar por su patrón de morfología y está influenciado en gran medida por la acción del citoesqueleto (Fernández-Martín et al, 2012).

Así, en el período inicial, tras los primeros contactos, se observa un patrón puntuado de Ve-cadherina, en el que, además, los filamentos de actina se organizan perpendicularmente a la membrana a través de la acumulación local de complejos de nucleación de actina (Ridley, 2006; Niessen and Gottardi, 2008). Estos complejos con morfología puntuada de Ve-cadherina son denominados de diversas formas en la literatura, como uniones discontinuas, irregulares o activas (Millan et al, 2010; Bentley et al, 2014). Este tipo de morfología es característica en respuesta a estímulos que reducen la integridad de la barrera endotelial como trombina, el factor de necrosis tumoral (TNF α) o VEGF-A (Millan et al, 2010; Dejana et al, 2009) (**Figura 6 izq.**).

Posteriormente, estos complejos en forma de puntos se asocian a cortos paquetes radiales de actina (Vasioukhin et al, 2000) que van a favorecer la estabilización de las primeras uniones de cadherina facilitando su fusión en adhesiones continuas. Según se van ensamblando las cadherinas, se va ensamblando también el “cinturón de adhesión” de actina, que se localiza a lo largo de la línea de membrana donde las cadherinas y cateninas se concentran (Bershadsky, 2004). De esta forma, la unión de las cadherinas con el citoesqueleto de actina es un requisito indispensable para el desarrollo de una unión estable y fortalecida (Vasioukhin et al., 2000). Este tipo de uniones, posicionadas de forma paralela a la membrana plasmática de forma continua, son denominadas en la literatura uniones continuas, regulares o inactivas (Millan et al, 2010, Bentley et al, 2014). Son comunes en vasos en homeostasis con una barrera endotelial intacta (Dejana et al, 2009) (*Figura 6 izq.*).

Además de estos dos tipos morfológicos de uniones, existe un tipo de morfología adicional, las denominadas uniones reticulares (Fernández-Martín et al, 2012). Se cree que es un paso intermedio durante la remodelación de contactos celulares, característico en ciertos estímulos, que refuerzan e incrementan la fortaleza barrera endotelial, como en los lípidos oxidados (Birukova et al, 2007), o esfingosina 1-phosphato (S1P) (Belvitch and Dudek, 2012). Es un paso previo de reorganización de Ve-cadherina, para finalizar en una unión de morfología continua, más intensa y engrosada. Este último compuesto en concreto, S1P, es capaz de inducir el fortalecimiento de las uniones celulares a dosis de concentración bajas de 1 mM, de forma casi inmediata, mediante el incremento del tráfico de proteínas accesorias de uniones endoteliales, la formación de un anillo de actina polimerizada alrededor de la célula y el reciclamiento de Ve-cadherin a la unión endotelial (Xiong and Hla, 2014) (Figura 6 der.).

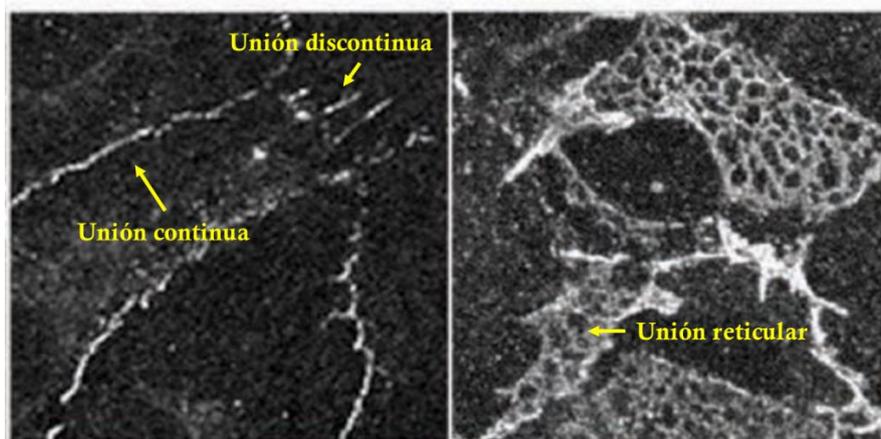


Figura 6. Tipos de patrones de unión de Ve-cadherina. Adaptado de Fernández-Martín et al, 2012.

Además, las tensiones que el citoesqueleto de actina ejerce en las uniones son importantes para la formación de éstas, y una evidencia de ello es que el reclutamiento de la VE-cadherina es estimulado por tensión dependiente de la proteína miosina II no muscular (Liu et al, 2010). Esta proteína se une a actina y es capaz de regular su contractilidad, siendo esta función regulada por la fosforilación de su cadena ligera (ppMLC) (Vicente-Manzanares et al, 2009). Estos datos apuntan a que en las uniones existe una red muy dinámica de filamentos de actina que

provocan la tensión necesaria para formar y estabilizar las uniones. Además, esta tensión, mediada por la proteína de adhesiones focales Vinculina, es necesaria para el remodelamiento de las uniones, protegiendo para que las uniones se abran pero las células no se separen demasiado unas de otras (Huvencers et al, 2012).

3.4. Mecanismos que regulan la función de Ve-cadherina en la barrera endotelial.

Las uniones endoteliales deben ser capaces de reaccionar ante determinadas situaciones, como en la activación de la célula de la punta en angiogénesis, pero a su vez deben ser estructuras estables capaces de resistir el flujo al que están continuamente sometidas y mantenerse unidas durante la migración colectiva. De esta manera, el endotelio cumple una función de barrera, esencial para la homeostasis vascular y el desarrollo de los nuevos vasos.

3.4.1. Tráfico de Ve-cadherina.

La dinámica de Ve-cadherina es importante para el mantenimiento de la barrera endotelial, para lo que es internalizada, reciclada y exocitada. El proceso de internalización de Ve-cadherina se realiza a través de la ruta endocítica de vesículas de clatrina, aunque en ciertas circunstancias puede darse por la ruta de las caveolas (Kronstein et al, 2012; Zhang et al, 2014). Para su internalización, es necesario la interacción de Ve-cadherina con adaptadores que permitan el proceso. Así, por ejemplo, en el tratamiento con VEGF-A, se produce la unión de Ve-cadherina con β -arrestina, que media la internalización. Esta internalización parece seguir el trazo de los filamentos de actina y microtúbulos, por lo que las vesículas de clatrina internalizadas podrían seguir esa vía de transporte (Hebda et al, 2013).

Una vez producida la internalización, Ve-cadherina puede ser destinada a su degradación por vía lisosomal o, en cambio, ser reciclada hacia la membrana. Aunque no se sabe con certeza todos los componentes que participan en la decisión del destino a seguir, sí se sabe que las cadherina pueden ser ubiquitinadas e interaccionar con vesículas positivas en Hrs (Sustrato del receptor del factor de

crecimiento de hepatocitos), o el adaptador de transporte de vesículas Rab5 para ser destinadas a su degradación en los lisosomas. Por otro lado, se ha descrito la colocación de vesículas positivas de Ve-cadherina con el adaptador Rab11, componente de los endosomas de reciclamiento a la membrana. Este proceso podría darse también a través del transporte por los microtúbulos (Causeret et al, 2005) (Figura 7).

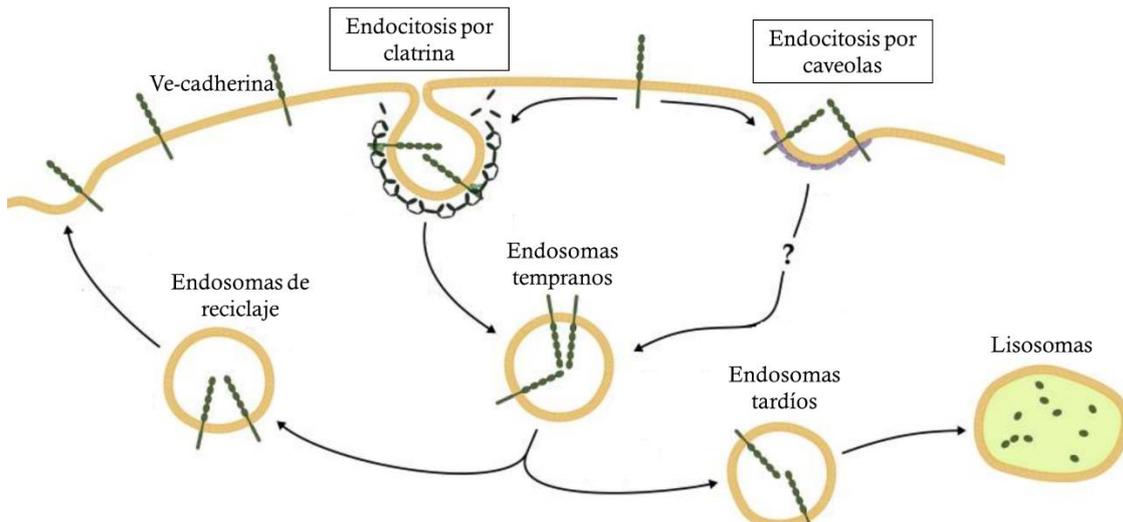


Figura 7. Tráfico de Ve-cadherina. Adaptado de Nanes and Kowalczyk, 2012

Aunque se sabe poco acerca de la exocitosis de la Ve-cadherina producida, se ha descrito que cPLA2 α (Fosfolipasa A2 α asociada al Golgi) participa en el tráfico de la Ve-cadherina recién sintetizada a la membrana plasmática (Regan-Klapisz et al, 2009) o como MiosinaX puede mediar en el transporte durante los contactos celulares iniciales (Almagro et al, 2010). Además RhoB una GTPasa puede inhibir Rac1 regulando este proceso (Marcos-Ramiro et al, 2016).

3.4.2. Fosforilación de Ve-cadherina.

El mecanismo mejor caracterizado por el que las uniones adherentes son remodeladas es el de la fosforilación de sus componentes, como, por ejemplo, Ve-cadherina, que es fosforilada gracias a las diversas dianas de fosforilación que presenta a lo largo de su estructura. Como consecuencia, puede internalizarse y

trasladarse a otros lugares de la membrana, o ser destinada para su degradación. La fosforilación de Ve-cadherina en sus tirosinas 658 y 685 es más frecuente en vasos venosos que en arteriales, y es necesaria para reestructurar las uniones de los vasos en respuesta a flujo (Orsenigo et al, 2012).

La fosforilación de Ve-cadherina es importante en el reciclamiento y en la función del endotelio como barrera, regulando la permeabilización; es decir, el paso de sustancias y células a través del endotelio. Así, moléculas como VEGF-A, trombina o histamina pueden inducir la fosforilación de residuos de la cola citosólica de la Ve-cadherina induciendo su internalización y produciendo un aumento en la permeabilidad de los vasos (Bazzoni and Dejana, 2004). La fosforilación de la Ve-cadherina también puede ser inducida por células leucocitarias, provocando un debilitamiento de la unión y favoreciendo la transmigración del leucocito a través de la barrera endotelial (Dejana et al, 2008).

Sin embargo, en un modelo de ratón en que se ha sustituido Ve-cadherina por un mutante en el que no se puede fosforilar la tirosina 685, hay un mayor porcentaje de aparición de edemas, por lo que en este modelo, la ausencia de fosforilación produce más permeabilidad en los vasos sanguíneos. (Sidibé et al, 2014). Estos resultados nos demuestran que la fosforilación de Ve-cadherina ha de ser continua y finamente regulada.

Además de Ve-cadherina, las cateninas p120, α -catenina y β -catenina también pueden fosforilarse en residuos específicos de tirosina por los mismos agentes capaces de fosforilar a la Ve-cadherina. Se ha observado en varios modelos que esta fosforilación afecta a la estabilidad de Ve-cadherina induciendo su internalización. (Huber and Weis, 2001, Lilien and Balsamo, 2005).

El estado de fosforilación de los diferentes componentes de las AJs es regulado a su vez por la inhibición de fosfatasas asociadas a ellas, como, por ejemplo, la fosfatasa Ve-PTP que se asocia con Ve-cadherina, y la defosforila (Baumer et al, 2006). La sobreexpresión de esta fosfatasa es capaz de aumentar la interacción entre Ve-cadherina y p120-catenina aumentando así la estabilización de la unión (Vestweber

et al, 2009). Otros estabilizadores de las uniones son el factor de crecimiento de fibroblastos, FGF (Factor de crecimiento de fibroblastos) que aumenta la estabilización de Ve-cadherina en la unión a través de la modulación de su unión a p120 (Murakami et al, 2008); la esfingosina-1-fosfato (S1P), que induce la reorganización del citoesqueleto de actina en cables corticales (Dudek et al, 2004; Shikata et al, 2003) y el aumento de Ve-cadherina en la superficie celular (Lee et al, 1999); y la angiopoietina 1, que inhibe la activación de la quinasa Src inducida por VEGF, inhibiendo de este modo la internalización de Ve-cadherina (Gavard et al, 2008). Todos estos procesos de fosforilación requieren de la presencia de energía en forma de ATP.

Por otra parte, el procesamiento de la Ve-cadherina por metaloproteasas (Herren et al, 1998; Luplertlop et al, 2006) o por otras proteasas como elastasa, catepsina G o tripsina también puede producir desestabilización de las AJs (Lampugnani et al, 2006; Lampugnani and Dejana, 2007). Los leucocitos y las células tumorales pueden secretar grandes cantidades de estas enzimas, induciendo el procesamiento de Ve-cadherina y aumentando así la extravasación celular y la permeabilidad vascular (Dejana et al, 2009).

Otras vías de señalización implicadas en desestabilización de AJs son la desencadenada por PAF (Factor de activación de plaquetas) (Hudry-Clergeon et al, 2005) y la del AMPc (adenosil monofosfato cíclico) que a través de la GTPasa Rap1 controla la organización de las uniones y de actina (Bos, 2005) y aumenta la capacidad “adhesiva” de la Ve-cadherina (Kooistra et al, 2007).

3.4.3. Alteraciones del citoesqueleto.

Además de los factores que afectan directamente a los componentes de las uniones, las alteraciones producidas en la estructura del citoesqueleto de actina también pueden provocar el desensamblaje de las uniones, así como de la función de barrera. La desestabilización del anillo cortical de actina por diferentes agentes produce un aumento de la permeabilidad endotelial (Shasby et al, 1982; Bogatcheva and Verin, 2008), mientras que la estabilización de este anillo previene la ruptura de

la barrera frente a agonistas inflamatorios (Bogatcheva and Verin, 2008; Phillips et al, 1989). Asimismo, se ha descrito que la excesiva polimerización de actina en fibras de estrés puede causar alteraciones en la barrera endotelial, pero la despolimerización extrema también altera la estructura de las uniones endoteliales (Bogatcheva et al, 2003; Moy et al, 2004). Por ello es necesario el equilibrio entre la “tensión centrípeta” (generada principalmente por las fibras de estrés) y la “tensión centrífuga” (generada por el anillo cortical de actina y los complejos de adhesión) para mantener la morfología de la célula y la función de barrera endotelial intactas (Bogatcheva and Verin, 2008).

Este equilibrio está sujeto a la regulación por parte de diferentes vías de señalización (Lee and Gotlieb, 2003; Mehta and Malik, 2006; Jacobson and Garcia, 2007). Las Rho GTPasas, por ejemplo, y sus dianas las ROCKs (rho Serine/threonine kinases) estimulan la contractilidad basada en la actina-miosina, generando fibras de estrés y adhesiones focales y aumentando la permeabilidad endotelial en respuesta a trombina e histamina (Wojciak-Stothard and Ridley, 2002; Braga, 2002; Gavard and Gutkind, 2008). Las fibras de estrés generadas en respuesta a estos estímulos son capaces de reorganizar los complejos de adhesión (Lim et al, 2001; Kouklis et al, 2003). Estas fibras influyen dramáticamente en la tasa y tamaño de los huecos intercelulares que se forman cuando las células se retraen (Dudek and Garcia, 2001; Patterson and Lum, 2001) generando tensión centrípeta que contrarresta la tensión centrífuga establecida por el anillo de actina.

Además, como se ha indicado anteriormente, esta tensión, mediada por la proteína de adhesiones focales Vinculina, es necesaria para el remodelamiento de las uniones, protegiendo para que las uniones se abran pero las células no se separen demasiado unas de otras (Huvneers et al, 2012).

3.5. Función de las uniones endoteliales en angiogénesis.

Como se ha indicado anteriormente, la regulación de las uniones endoteliales es un proceso importante en la angiogénesis. La integridad de la barrera endotelial

ha de ser mantenida, pero las uniones han de remodelarse para permitir el avance de las células durante el crecimiento del vaso.

Los embriones de ratones deficientes en Ve-cadherina no son viables debido a que presentan defectos en el desarrollo vascular (Gory-Fauré et al, 1999; Carmeliet et al, 1999). Los resultados de los diversos estudios que intentaron determinar su papel en angiogénesis, son controvertidos. Por una parte, ratones con una delección inducible de Ve-cadherina en el endotelio, presentan un fenotipo de excesiva vascularización en el modelo del desarrollo vascular postnatal en las retinas. Sin embargo, esos vasos presentaban menor estabilidad y maduración. En este mismo estudio, en ensayos en formación de estructuras similares a capilares en geles de fibrina, el bloqueo de Ve-cadherina provoca la ruptura de la unión entre las nuevas estructuras nacientes y el esferoide, debido a la falta de estabilidad en las uniones en las células, por lo que los túbulos formados se despegan de la microesfera (Gaengel et al, 2102).

En contraste con estos resultados, en otro estudio en el que analizaron la angiogénesis producida en cuerpos embrionarios (“embryoid bodies”) deficientes en Ve-cadherina, éstos presentaron defectos en la formación de estructuras tubulares de células endoteliales (Gentil-dit-Maurin et al, 2010). En trabajos realizados en pez cebra, se describió la falta de estabilidad en las uniones establecidas entre los vasos en ausencia de Ve-cadherina (Montero-Balaguer et al, 2009). Este defecto puede deberse a la importancia que tiene esta proteína en la formación de las anastomosis o uniones de vasos nacientes que se encuentran (Lenard et al, 2013). En concordancia con estos estudios, las células endoteliales de morfolidos de pez cebra deficientes en Ve-cadherina presentaban defectos en la estabilización de los vasos, y en la elongación de las células, afectando al citoesqueleto de actina, el cual resulta ser fundamental para los cambios en morfología celular de las células al formar los vasos (Sauter et al, 2014).

Los niveles de expresión de Ve-cadherina también son importantes en el desarrollo vascular, ya que ratones deficientes en el factor de transcripción ERG (gen relacionado con ETS) expresaban menos Ve-cadherina en las retinas en desarrollo, presentando defectos en el crecimiento y en la estabilidad de los vasos (Birdsey and Shah et al, 2015).

En cuanto a la morfología del patrón de las uniones adherentes en angiogénesis, se requieren más estudios para clarificar realmente su papel. Un estudio clasificó la morfología de Ve-cadherina en seis categorías, de más activas a más inactivas. La descripción de activas corresponde a las previamente clasificadas en la literatura con uniones irregulares o discontinuas, mientras que las inactivas correspondían a uniones lineares continuas o regulares. Este grupo describió que las uniones endoteliales de los vasos de la retina en desarrollo de los ratones, se encuentran formando un mosaico de morfología de uniones, entre activas (irregulares o discontinuas) e inactivas (regulares o continuas) (Bentley et al, 2014). Este patrón se localizaba en la parte frontal del avance de la retina, mientras que las partes más alejadas del frente, donde se produce la estabilización y maduración de los vasos mediante el recubrimiento por células murales, presentaban un predominio de uniones continuas o inactivas.

Se analizó además qué sucedería en situaciones en las que se producía un predominio de uniones de un tipo u otro. Inactivando la proteína Tsad (Adaptador específico de células T), un regulador de la permeabilidad y fosforilación de Ve-cadherina (Sun et al. 2012), a pesar de que se seguía observando el mosaico en la morfología de las uniones, éste se encontraba desviado hacia las uniones inactivas. Ensayos de angiogénesis con cuerpos embrionarios deficientes en esta proteína, presentaban defectos en la formación de túbulos de células endoteliales (Gordon et al, 2016). En concordancia con estos resultados, en un ratón mutante en la tirosina 949 del receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGFR2, que impide la fosforilación de este receptor, el patrón del mosaico uniones se encontraba escorado hacia las uniones de tipo continuo o inactivo. A pesar de que estos ratones no presentaban defectos en angiogénesis, sí que presentaban defectos en la respuesta a VEGF-A en permeabilización de los vasos sanguíneos. La mayor estabilidad de los vasos endoteliales reducía la frecuencia de metástasis en estos ratones (Li et al. 2016).

A raíz de estos estudios, predomina, en el campo de las uniones endoteliales en cáncer, una corriente de pensamiento acerca de la necesidad de desarrollar terapias que normalicen las uniones de los vasos sanguíneos en los tumores, para así mejorar el transporte de químicos a esas regiones, e impedir la extravasación de células

tumorales y otros factores reduciendo la probabilidad de desarrollar metástasis (Magrini et al, 2014; Maes et al, 2014; Dejana and Lampugnani, 2014).

De la misma forma, en el mismo trabajo acerca del patrón de Ve-cadherina en las retinas, se estudió una situación en la que se produjese una angiogénesis patológica, activando la vía de Notch tratando con DAPT, un inhibidor de la gamma secretasa, que es la proteína que procesa Notch. Este inhibidor provoca que no se produzca la selección de células del tallo por inhibición lateral, por lo que se genera un fenotipo de hipervascularización con presencia de excesivo número de células de la punta, y un excesivo número de ramificaciones y densidad vascular (Suchting et al, 2007). Al analizar el patrón de uniones en retinas tratadas con DAPT, se encontró que el mosaico se encontraba desplazado hacia un mayor porcentaje de uniones activas o discontinuas. Existen diversos estudios en los que un exceso de uniones irregulares o discontinuas correlaciona con defectos en angiogénesis, en los que estos se relacionan además con defectos en el citoesqueleto de actina de las células endoteliales (Wimmer et al, 2012; Yoshioka et al, 2012; Fraccaroli et al, 2015).

Estos estudios parecen reflejar que, para que el proceso de angiogénesis fisiológica se produzca de forma adecuada, es necesario que haya un balance entre uniones activas e inactivas. De hecho, en el estudio en el que se describió el mosaico de morfología de Ve-cadherina, en un modelo de glioblastoma en ratones, las uniones de los vasos sanguíneos presentaban acumulación de patrones inactivos o activos, pero no un mosaico como tal (Bentley, 2014).

4. Metabolismo Endotelial

4.1. Rutas metabólicas en el endotelio.

El metabolismo es el conjunto de transformaciones químicas, físicas y biológicas que se realizan en los seres vivos para, por una parte, producir la necesaria

energía en forma de ATP para el desarrollo de sus funciones vitales, y, por otra parte, sintetizar las macromoléculas que los componen.

Los nutrientes de los que se sirven las células para obtener energía son los glúcidos, los ácidos grasos y los aminoácidos. Así, las rutas metabólicas que ocurren en células endoteliales son las que degradan estos sustratos.

La glucosa es degradada en la glucólisis, pudiendo ser anaerobia o aerobia, ya que, en este caso último, los metabolitos resultantes son transportados a la mitocondria para ser degradados en la fosforilación oxidativa consumiendo oxígeno (Eelen et al, 2015). Los ácidos grasos tienen este mismo destino, previa oxidación en el citoplasma. Otra ruta que las células endoteliales pueden utilizar es la oxidación de la glutamina (Eelen et al, 2015).

Para construir macromoléculas existen otras vías metabólicas, las cuales pueden entrecruzarse con las vías de obtención de energía, utilizando metabolitos intermedios de estas rutas, un proceso que se conoce como anapleurosis. Por ejemplo, la glucólisis aporta alguno de sus metabolitos intermedios, como el piruvato, para la síntesis de aminoácidos y proteínas. Además, los metabolitos de la parte superior de la ruta, como la glucosa-6-fosfato, sirven para generar poder reductor, y para producir nucleótidos y glúcidos complejos para glicosilar proteínas. Para generar estos metabolitos, se requiere el ciclo de las pentosas fosfato (Eelen et al, 2015).

Como se ha descrito, en homeostasis las células endoteliales se encuentran en estado quiescente. El metabolismo va en la misma dirección, ya que el flujo laminar genera una inhibición de la glucólisis, mediante la represión de la expresión de algunas enzimas de esta ruta. Además, el contenido de mitocondrias de las células endoteliales es significativamente bajo en estas condiciones. (Doddaballapur et al, 2015).

Sin embargo, cuando se recibe algún estímulo, como los que promueven la angiogénesis, el endotelio se activa y, a su vez, su metabolismo cambia también, proceso conocido como cambio angiogénico (Verdegem et al, 2014). La glucólisis

resulta ser la ruta metabólica más importante en células endoteliales tras esta activación (deBock et al, 2013), sin ser acoplada a la fosforilación oxidativa a pesar de la alta disponibilidad de oxígeno por parte de las células endoteliales. La preferencia por esta ruta anaerobia en presencia de oxígeno es conocido como el “efecto Warburg” (Warburg, 1956).

4.2. Metabolismo endotelial en angiogénesis.

Las diferentes rutas metabólicas regulan de manera diferente el proceso de formación de vasos (Figura 8).

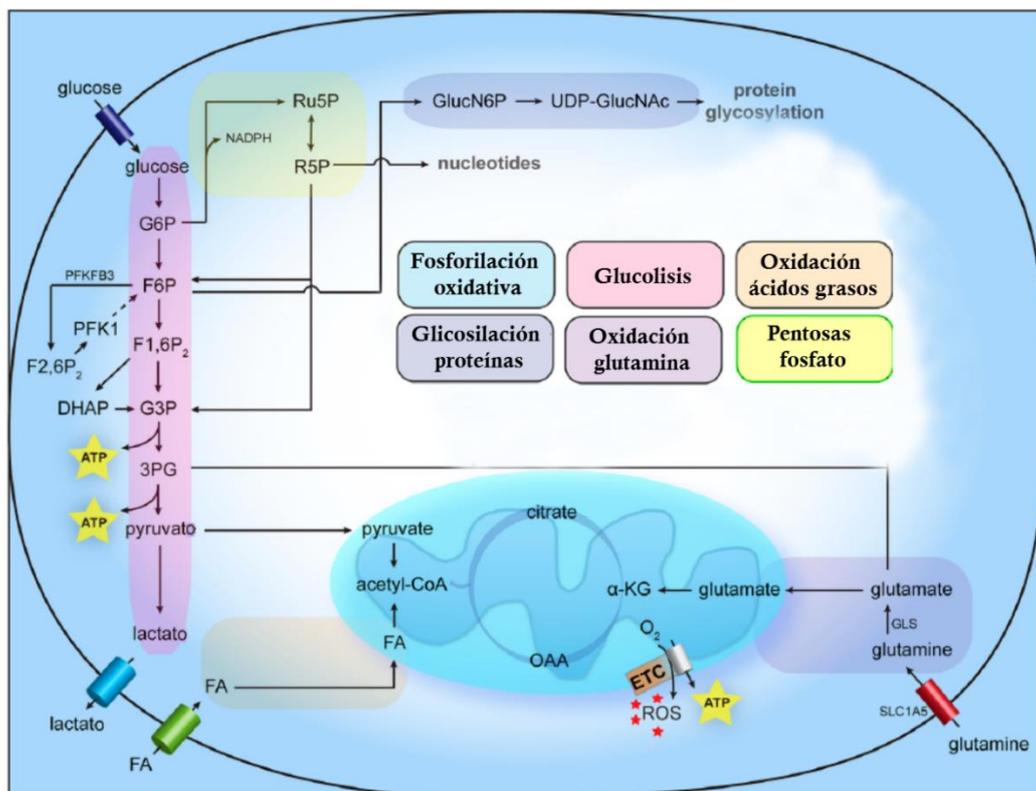


Figura 8. Rutas metabólicas endoteliales. Adaptado de Eelen et al, 2015.

La inhibición de la glucólisis disminuye la angiogénesis. De hecho es la vía que más contribuye a la síntesis de ATP en células endoteliales (deBock et al, 2013; Polet and Feron, 2013). El tratamiento de células endoteliales con 2-Deoxyglucose, un competidor de la glucosa, reduce la formación de túbulos “in vitro” (Chuang et al,

2015). La delección de proteínas de la glucólisis específicamente en el endotelio reduce la angiogénesis, como ha sido demostrado en trabajos realizados con Fosfofructoquinasa bifosfato 3 (PFKFB3) (deBock et al, 2013) o Hexoquinasa2 (HK2) (Yu et al, 2017). HK2 es la enzima que regula la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato, el primer paso de la glucólisis, que desencadena toda la vía metabólica. Por su parte, PFKFB3 es una enzima reguladora alostérica de la glucólisis, ya que el producto de su acción, fosfofructosa 2,3 bifosfato, es un activador de la enzima PFKF1, aumentando el consumo de glucosa. En ratones mutantes para una u otra isoforma, se observaron defectos en el desarrollo angiogénico de los vasos sanguíneos de la retina postnatal. Ambas delecciones provocan defectos en procesos celulares endoteliales importantes en la angiogénesis, como la proliferación y la migración, o incluso en la selección de células de la punta y del tallo, en el caso de PFKFB3. Estos hallazgos, unido al hecho de que la glucólisis es la ruta mayoritaria de obtención de energía en forma de ATP para las células, demuestran la importancia de la regulación del metabolismo de la glucosa en células endoteliales (deBock et al, 2013).

La ruta de glicosilación de proteínas también es importante en angiogénesis, ya que proteínas como VEGFR2, o Notch, requieren de este proceso para desarrollar sus funciones. Cuando se inhibe la glucólisis mediante el tratamiento con 2-DG, esta vía de producción se inhibe, reduciéndose la angiogénesis (Merchan et al, 2010).

La ruta de las pentosas fosfato es importante en la producción de poder reductor en forma de NADPH y en sustratos necesarios para la formación de nucleótidos. La inhibición de esta ruta, mediante un inhibidor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, reduce la proliferación y la migración de las células endoteliales (Vizán et al, 2009).

La producción de ATP a partir de ácidos grasos mediante su oxidación (FAO) en la mitocondria, es la ruta metabólica que produce más ATP en proporción con otras vías. Sin embargo, en células endoteliales no parece contribuir en este sentido, ya que la inhibición de esta ruta no reduce la cantidad de ATP de las células endoteliales (Schoors and Bruning et al, 2015). Esto podría deberse a la necesidad de una fuente rápida de producción de energía en angiogénesis, ya que la FAO es una ruta mucho más lenta que la glucólisis. Otra explicación sería la priorización de la no utilización

de oxígeno, para que pueda ser transportado en mayores cantidades a células perivasculares (Ghesquière et al, 2014). La función de las mitocondrias en angiogénesis es proporcionar metabolitos para la construcción de nucleótidos para permitir la proliferación de las células endoteliales. Este proceso parece ocurrir únicamente en ciertos tipos celulares, como el endotelio y los fibroblastos (Schoors and Bruning et al, 2015). La contribución de la oxidación de ácidos grasos a las células proliferativas endoteliales se ve reforzada por el hecho de que, al inhibir esta ruta mediante la molécula embelin, se producía un aumento de muerte celular, que es exclusivo de células endoteliales. Este aumento de apoptosis únicamente ocurría en células que estaban proliferando, y no cuando las células se encontraban en quiescencia (Coutelle et al, 2014).

Por último, las rutas metabólicas en las que están implicados los aminoácidos también tienen un papel en células endoteliales que puede afectar a la angiogénesis. La inhibición de la glutaminasa, enzima que convierte la glutamina en glutamato, provoca una entrada en senescencia prematura, y una reducción de la proliferación de las células endoteliales (Unterluggauer et al, 2008). La importancia de la glutamina se ve reflejada en que puede contribuir a las rutas tanto con carbonos como con nitrógeno (deBerardinis et al, 2010). Por otro lado, el metabolismo de la serina es a la vez crucial, ya que puede contribuir tanto al balance oxidación-reducción, como a la síntesis de nucleótidos, proteínas y síntesis de lípidos (Tibbetts et al, 2010).

El metabolismo en angiogénesis puede estar regulado de forma genética mediante diferentes factores de transcripción. Uno de ellos es FOXO1, un factor del cual está ampliamente descrito que favorece la homeostasis celular (Paik et al, 2007; Eijkelenboom and Burgering, 2013). FOXO1 activa la transcripción de genes cuando es translocado al núcleo. En un estudio, utilizando el modelo de desarrollo vascular en retina de ratones neonatos, se describió que, dependiendo de la región de la retina que analizásemos, este factor tenía una característica localización subcelular. Cuando se analizaba en el frente de avance de los nuevos vasos, FOXO1 tenía una localización citoplasmática, mientras que en vasos más alejados, que se encuentran en la fase de maduración de la angiogénesis, este factor se encontraba en el núcleo. En este mismo estudio, utilizando un ratón mutante en el que FOXO1 era constitutivamente activo, la angiogénesis se reducía. El mecanismo que explicaba

este déficit, era que el metabolismo tanto de la glucólisis, como de la oxidación en las mitocondrias se encontraba reducido. Sin embargo, al coexpresar junto a la forma constitutivamente activa de FOXO1, el factor de transcripción Myc, se corregían los defectos en angiogénesis, ya que este factor favorece la expresión de enzimas metabólicas, (Wilhelm et al, 2016). Myc es un potenciador del metabolismo, con un papel clave en el desarrollo de los procesos tumorales (Adhikary and Eilers, 2005; Dang, et al, 2013). Todos estos datos apuntan a que la regulación del metabolismo tiene un papel crucial en la angiogénesis.

Todo este capítulo ha demostrado la importancia de las diferentes rutas metabólicas a un proceso fisiológico fundamental como la angiogénesis. Además, el hecho de que los productos intermedios de las diferentes vías puedan interconectarse con las otras rutas metabólicas, pone de relieve la necesidad de la regulación del metabolismo en la fisiología de las células endoteliales.

4.3. Compartimentalización del metabolismo.

Aunque se ha descrito lo importante que es la regulación del metabolismo endotelial, y la necesidad de un aporte de ATP para la realización de los diferentes procesos endoteliales que están implicados en la angiogénesis, no se ha tratado cuál es la fuente de ese aporte en la célula. Debido a las dificultades de difusión del ATP a lo largo de la célula para llegar a los lugares en los que se requiere un mayor aporte, no es factible una distribución homogénea de las enzimas en la célula (Jones, 1986).

La compartimentalización de las enzimas para poder contribuir de manera más eficiente a los procesos subcelulares es necesaria. Así, en el músculo, las proteínas de la glucólisis se encuentran asociadas en pequeños subconjuntos, que permiten una mayor coordinación. Se han descrito tres subcomplejos en músculo, el primero formado por aldolasa (ALD), gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y fosfofructoquinasa 1 (PFK); el segundo formado por la Triosa fosfato isomerasa (TPI) y la fosfoglicerato quinasa (PGK); mientras que el último complejo está formado por fosfoglicerato mutasa (PGM), enolasa (ENO), y piruvato quinasa (PK)

(Menard et al, 2014). Estos complejos pueden asociarse a estructuras tubulares celulares, como los microtúbulos y el citoesqueleto de actina, para así ser transportados. Mientras que algunas de estas enzimas son inactivadas al unirse al citoesqueleto, como la Aldolasa (Hu et al, 2016), o PFK (fosfofructoquinasa) (Real-Hohn et al, 2010), otras aumentan su actividad, como la Hexoquinasa, o hay enzimas en las que incluso no se modifica, como en la unión de piruvato quinasa a los microtúbulos (Vertessy et al, 1997). Estos descubrimientos han puesto de relieve la posibilidad de que los complejos de enzimas y estructuras tubulares formen un sensor metabólico celular, que permita coordinar tanto la presencia de enzimas en lugares que se requiera un aporte de energía extra, como la regulación de su actividad (Norris et al, 2013).

La compartimentalización de enzimas en ciertas regiones subcelulares ha hecho que aparezca el término de “producción local de ATP”, sustituyendo a la idea de un metabolismo celular general homogéneo. Así, han ido surgiendo estudios en los que se demostraba este nuevo paradigma, como la localización en forma de filamento de PFK1 en lugares cercanos a la membrana plasmática en células de cáncer de mama de rata (Webb et al, 2017).

En los axones de las neuronas se realiza el transporte de vesículas de neurotransmisores y otras moléculas, que han sido producidas en el cuerpo de la neurona. Las mitocondrias no se localizan en los axones, por lo que la fuente de energía que permita el transporte de estas vesículas a través de los microtúbulos que recorren esta estructura es otra. GAPDH se asocia a una proteína adaptadora de las vesículas, Huntingtina, formando un complejo con PGK1, enzima que produce directamente ATP, el cual es la fuente que utilizan estas vesículas para transportarse a lo largo de los microtúbulos hasta el polo distal del axón (Zala et al, 2013).

Estos procesos también han sido descritos en células endoteliales. La proteína reguladora de la glucólisis PFKFB3 puede localizarse en ciertas regiones subcelulares como los lamelipodias. Así, sirve como una fuente de ATP para los procesos citoesqueléticos, como la formación de filopodias (deBock et al, 2013). Además, la actividad de esta proteína afecta a las uniones endoteliales, ya que tras la estimulación con altas dosis patológicas de VEGF, las cuales provocan defectos en

angiogénesis y en el patrón de Ve-cadherina en retinas postnatales de ratones, si en estas situaciones se inhibe la actividad de esta proteína, se conseguía normalizar el patrón de mosaico de las uniones adherentes (Cruys et al, 2016).

La producción local de ATP no es exclusiva de enzimas de la glucólisis, como hemos descrito en nuestro laboratorio. Emmprin es una proteína de la familia de las inmunoglobulinas que se encuentra localizada en las uniones endoteliales, asociada a gamma catenina. Estas dos proteínas forman un complejo con Nm23, una nucleótido difosfato quinasa, que provee ATP de forma local, regulando las dinámicas del citoesqueleto y de las uniones endoteliales (Moreno et al, 2014).

Por lo tanto, no solo es fundamental la regulación del metabolismo de forma general en células endoteliales, sino que la localización subcelular de las enzimas que generan ATP resulta crucial para los procesos angiogénicos.

5. Piruvato Quinasa M2 (PKM2)

5.1. Expresión de las diferentes isoformas de piruvato quinasa.

La piruvato quinasa es la enzima que cataliza la última reacción de la glucólisis, convirtiendo fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato, generando en este paso ATP de forma directa, mediante la transferencia de un fosfato desde el PEP a adenosina difosfato (ADP).

Existen diferentes isoformas de piruvato quinasa dependiendo del tejido del organismo. La isoforma L se expresa en el hígado, mientras que la isoforma R es expresada en eritrocitos. Las isoformas M (M1 y M2), por su parte, tienen una expresión más ubicua (Mazurek, 2011).

El gen de PKM consta de 12 exones. PKM1 y PKM2 difieren en su estructura en si se transcribe el exón 9 o el exón 10 del gen (Figura 9). Este proceso se produce por procesamiento alternativo (splicing) (Noguchi et al, 1986). Los factores de procesamiento, PTBP1 (polypyrimidine tractbinding protein 1), hnRNPA1 y hnRNPA2 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteinA1 y A2) reprimen la transcripción del exón 9, favoreciendo la expresión de PKM2 (Clower et al, 2010). Por su parte el factor de empalme rico en Serina/arginina 3 (SRSF3) reprime el exón 10 (Wang et al, 2012). Sin embargo, la delección de esos tres factores que reprimen el exón 9, y por lo tanto la expresión de PKM1, no es suficiente para incrementar la expresión de esa isoforma en un nivel similar a la expresión de PKM2, por lo que debe existir algún factor o proceso adicional que esté implicado (Israelsen and Vander Heiden, 2015). Además, diferentes micro ARNs pueden colaborar con los factores de empalme para favorecer una u otra isoforma, como el miRNA124 o miRNA133 (Taniguchi et al, 2015).

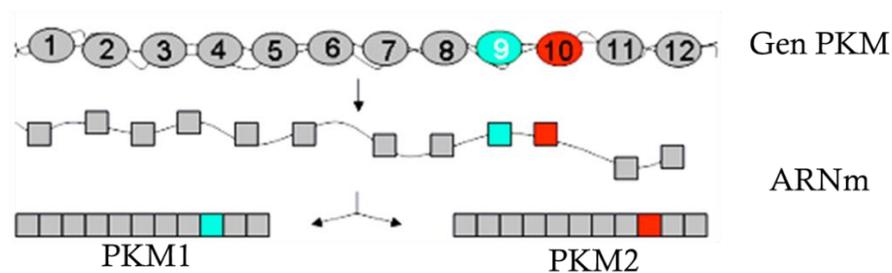


Figura 9. Esquema de la expresión del procesamiento alternativo de las dos isoformas de PKM.

Adaptado de <http://atlasgeneticsoncology.org>

La diferencia entre una y otra isoforma radica en la forma que se regula su actividad, ya que mientras que PKM1 es constitutivamente activa, la actividad de PKM2 puede ser regulada de forma alostérica y mediante modificaciones postraduccionales (Yamada et al, 1990; Kalaiarasan et al, 2014). Esta diferente regulación de la

actividad explica además la diferencia en el patrón de expresión a lo largo del organismo.

Durante el desarrollo embrionario, proceso en los que se producen grandes cambios que requieren de una gran plasticidad celular, la isoforma prioritariamente expresada es la M2 (Kumar et al, 2007). En el organismo adulto, se observa un patrón de expresión de una proteína u otra dependiendo del órgano. Así, en órganos que requieren un aporte constante de energía, como el corazón, el cerebro, y el músculo esquelético, la isoforma expresada mayoritariamente es PKM1, mientras que otros órganos como el pulmón, el bazo, intestino delgado o el páncreas, predomina PKM2. Hay ciertos órganos que no tienen predilección por la expresión de una u otra, como el colon, o el estómago (Taniguchi et al, 2015).

En células tumorales, la isoforma predominante es PKM2, por lo que es relacionada su expresión con el “efecto Warburg” característico de este tipo de células. De hecho, la expresión de esta isoforma es considerada un marcador tumoral (Mazurek, 2011).

5.2. Estructura de PKM2.

La piruvato quinasa puede estar conformada en forma de monómero, dímero, o tetramero, que se forma mediante la asociación de dos dímeros. La estructura de un monómero se compone de tres dominios principales denominados A, B y C, y de un pequeño dominio N-terminal (Muirhead et al, 1986) (Figura 10).

El dominio A es el mayor de la proteína, y está compuesto por un barril TIM simétrico (8 hélices alfa y 8 láminas beta alternadas). El sitio activo catalítico de la proteína se localiza en la zona final del barril, en uno de los giros entre el dominio A y el dominio B. Este último es móvil, cerrándose sobre el sitio activo cuando los sustratos de la reacción se encuentran unidos a él (Larsen et al, 1998).

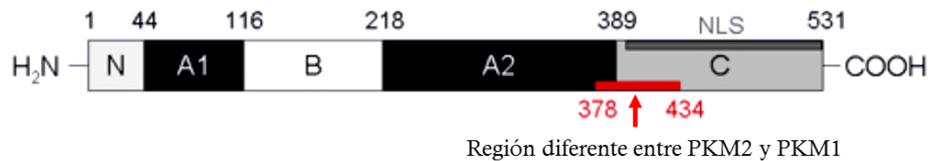


Figura 10. Estructura de PKM2. Adaptado de <http://atlasgeneticsoncology.org>

El dominio C se encuentra opuesto al dominio A, y es donde se encuentra la zona reguladora de la actividad. Además, en este dominio se encuentran las regiones que permiten la interacción entre los monómeros y los dímeros de la piruvato quinasa para formar los tetrámeros. Esta es la región en donde se encuentran los 22 aminoácidos que diferencian PKM1 de PKM2 (Jurica et al, 1998).

5.3. Regulación de la actividad de PKM2.

Como se ha indicado anteriormente, PKM2 puede conformarse como un monómero, dímero o tetrámero. Mientras que las forma monoméricas y diméricas presentan una menor actividad catalítica, el tetrámero es la forma considerada activa, aunque su conformación es en realidad un dímero de dímeros (Chaneton and Gottlieb, 2012).

La modificación de la actividad de PKM2 es importante, ya que puede modular todas las rutas metabólicas celulares dependiendo de las circunstancias. Cuando se encuentra inactiva puede favorecer la acumulación de metabolitos intermedios de la glucólisis, que pueden ser utilizados por el resto de vías metabólicas para la producción de macromoléculas destinadas a la división celular. PKM2 puede contribuir a la regulación del estrés oxidativo, ya que su inhibición puede desviar los metabolitos de la glucólisis a la ruta de las pentosas fosfato para producir poder reductor (Anastasiou et al, 2011). Por otro lado, la activación de PKM2 es una forma de regular el flujo de la glucólisis, generando una gran cantidad de energía en forma de ATP (Vander Heiden et al, 2010; Gui et al, 2013).

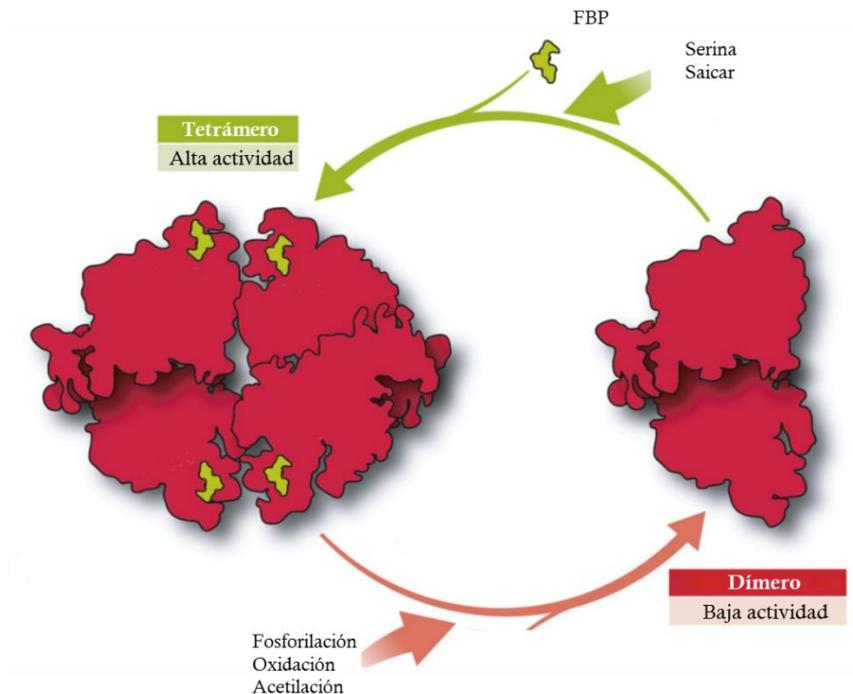


Figura 11. Regulación de la actividad y conformación de PKM2. Adaptado de Dayton et al, 2016.

La regulación de la actividad de PKM2 puede realizarse de varias formas. Primero, como hemos se ha explicado en el apartado anterior, mediante la modulación del procesamiento alternativo. En segundo lugar, la regulación puede realizarse de forma alostérica, y por último, en tercer lugar, mediante modificaciones postraduccionales e interacciones con otras proteínas (Figura 11).

5.3.1. Regulación alostérica de PKM2.

La regulación alostérica consiste en que la unión de ciertos metabolitos a regiones reguladoras de una proteína en cuestión, provocan un cambio conformacional, que modifica su actividad. En PKM2, la mayoría de factores alostéricos positivos promueven la conformación tetramérica, mientras que los negativos favorecen el dímero o estabilizan el monómero (Anastasiou et al 2012). Sin embargo, factores como fenilalanina inactivan PKM2 aun manteniéndose la conformación del tetramero (Weber et al, 1969). Se han identificado una gran cantidad de metabolitos que pueden regular la actividad de PKM2, los cuales se presentan en la [tabla 1](#).

Tabla1. Moléculas reguladoras alostéricas de la actividad de PKM2

Molécula	Efecto en actividad	Referencia
Fructosa bifosfato 1,6	Activador	Taylor et al, 1967
Fenilalanina	Inhibidor	Morgan et al, 2013
Alanina	Inhibidor	Schulz et al, 1975
Serina	Activador	Chaneton et al, 2012
Hormona tiroidea T3	Inhibidor	Ashizawa et al, 1991
Saicar	Activador	Keller et al, 2012
Oxalate	Activador e inhibidor	Reed et al, 1974; Dombrauckas et al, 2005

Además de estas moléculas, existen moduladores sintéticos de la actividad de PKM2 (Boxer et al, 2010; Jiang et al, 2010; Walsh et al, 2011).

5.3.2. Regulación por modificaciones postraduccionales.

PKM2 puede unirse a proteínas fosforiladas en tirosinas (Christofk et al, 2008), como es el caso de la unión al receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGFR1), que fosforila PKM2 en la tirosina 105 (Y105) (Hitosugi et al, 2009) inhibiendo su actividad. Otra fosforilación que ha sido descrita es la realizada por ERK 1/2 en el la serina 37 (S37) (Yang et al, 2012).

Además de fosforilaciones, PKM2 puede sufrir otras modificaciones. Las acetilaciones de las lisinas 305 (K305) y 433 (K433) inhiben la actividad de la proteína. En concreto, la modificación en K305 permite el desvío de metabolitos de la glucólisis para la síntesis de macromoléculas (Lv et al, 2011; Lv et al, 2013). Por último, la oxidación en la cisteína 357 (C357), en consecuencia a un aumento de

especies reactivas de oxígeno (ROS), puede reducir la actividad de PKM2 (Anastasiou et al, 2011).

5.4. Funciones no canónicas de PKM2

Trabajos recientes han descrito una función especial de PKM2 como proteína quinasa. Esto es, que PKM2 transferiría directamente el fosfato de PEP a proteínas, sin pasar por el paso previo de generación de ATP. Esta función le permitiría regular diversas funciones, como la transcripción de genes mediante la fosforilación directa de Histona3 en el núcleo (Yang et al, 2012). Otras dianas de la función proteína quinasa de PKM2 son STAT3 (Gao et al, 2012) o MLC2 (Jiang et al, 2014). Para realizar estas funciones, PKM2 se localizaría en el núcleo (Yang et al, 2012).

Sin embargo, existe una controversia de que PKM2 tenga realmente esta actividad como proteína quinasa. Un estudio describió que no existe evidencia de la transferencia directa de fosfato desde fosfoenolpiruvato, y que en realidad los estudios anteriormente mencionados pueden deberse a contaminaciones de ATP en sus ensayos (Hosios et al, 2015). Además, no se han descrito en eucariotas la existencia de proteínas quinasas dependientes de fosfoenolpiruvato, habiendo únicamente evidencia de su presencia en bacterias (Postma et al, 1985).

5.5. Compartimentalización de PKM2

A pesar de que PKM2 es una proteína citoplasmática, ha sido descrita en diferentes regiones subcelulares. Como se indicó en el apartado anterior, PKM2 puede localizarse en el núcleo. Otros lugares donde se ha descrito la presencia de esta isoforma es en vesículas del retículo sarcoplásmico (Xu and Becker et al, 1998), o las mitocondrias (Liang et al, 2017).

Por último, la localización de PKM2 en asociación con estructuras tubulares, como los microtúbulos o los microfilamentos de actina, ha sido descrita en diversos trabajos, como se indicó anteriormente (Norris et al, 2013).

Por otro lado, PKM2 puede formar complejos con diferentes proteínas de la glucólisis. Ha sido descrita formando supercomplejos con otras proteínas glucolíticas, favoreciendo la eficiencia de la utilización de la glucosa (Mazurek et al, 2001).

5.6. PKM2 en patologías.

5.6.1. Cáncer.

Como se ha explicado anteriormente, la mayoría de tumores presentan una fuerte expresión de PKM2, lo que ha sugerido que sea usado como marcador tumoral. Se ha descrito que las células tumorales cambian su expresión desde PKM1 a PKM2 (Christofk et al, 2008b). Sin embargo, existen trabajos en los que niegan la existencia de este cambio, y que describen que en muchos de los tejidos analizados la isoforma mayoritaria era ya PKM2 (Bluemlein et al, 2011), o que sí que se produce una disminución de PKM1, pero sin que la expresión de PKM2 incremente de acorde a esa reducción (Zhan et al, 2015).

La regulación de la expresión de PKM2, y su función en los procesos tumorales, ha sido analizada en una gran cantidad de estudios, que reflejan datos contradictorios. Por un lado, la inhibición de PKM2 mediante un ARN de interferencia reducía el crecimiento tumoral, y favorecía la apoptosis de células tumorales (Goldberg and Sharp, 2012). Sin embargo, en un modelo murino en la que se ha delecionado el exón 10 del gen de la piruvato quinasa, la no expresión de PKM2 no reducía el tamaño de los tumores, ya que eso dependía de que PKM1 se expresase o no. Así, los tumores en los que PKM1 no era expresada seguían proliferando, pero en los que sí se expresaba el crecimiento de los mismos se detenía (Israelsen et al 2013). Esto se debía a que el cambio de expresión a PKM1 inhibe la proliferación de las células tumorales, ya que, al ser constitutivamente activa, no permite que los metabolitos intermedios de la glucólisis sean destinados a la construcción de macromoléculas (Lunt et al, 2015). Además, en este mismo modelo, la deleción de PKM2 provocaba un aumento de la incidencia de hepatocarcinomas (Dayton et al, 2016). Estos

resultados ponen de manifiesto que la modulación de la expresión de PKM2 no es lo únicamente necesario, sino que hay otros factores que pueden afectar.

La regulación de la actividad de PKM2 en procesos tumorales, por otro lado, también ha arrojado resultados contradictorios. A pesar de que se ha descrito que la inhibición de la actividad de PKM2 provoca un aumento en el tamaño de tumores, debido a que el dímero de PKM2 favorece la proliferación celular (Hitosugi et al, 2009), y que si se favorece la formación de la forma tetramérica más activa, se reduce la tumorigénesis (Anastasiou et al, 2012), no deja de ser controvertido, ya que una molécula anticancerígena y reductora del tamaño de tumores, como shikonina, reduce la actividad de PKM2 (Chen et al, 2011). En un estudio incluso se relaciona el aumento en tumores con una mayor expresión y actividad de PKM2, por lo que el tratamiento con shikonina reducía su tamaño (Li et al, 2014). Además, la inhibición o reducción de PKM2 reducía además la quimioresistencia de tumores de vejiga (Wang et al, 2017).

En conclusión, aunque la importancia de PKM2 es evidente en los procesos tumorales, aún es necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos que regulan su función, para así poder desarrollar terapias efectivas contra esta patología.

5.6.2. Otras patologías.

A pesar de que la mayoría de estudios patológicos de PKM2 se han realizado en tumores, se ha descrito el rol de esta proteína en otros procesos.

Se ha descrito un papel de esta proteína en la regulación de los procesos inflamatorios. La expresión de PKM2 aumenta en macrófagos activados con LPS, favoreciendo la expresión de IL- β . Esta función depende de la actividad de PKM2, ya que la activación de PKM2 con la molécula TEP-46, bloquea la expresión de IL- β (Palsson-McDermott et al, 2015). Por otro lado, la inhibición de PKM2 con shikonina reduce la secreción de HMGB1, una potente citoquina proinflamatoria (Andersson et al, 2000), y protege contra la endotoxemia inducida por LPS (Yang et al, 2014).

Se ha relacionado la expresión y actividad de PKM2 en otro proceso inflamatorio, la nefropatía diabética. Así, la activación de PKM2 con TEP-46 mejoraba los síntomas de esta patología (Qi et al, 2017).

En otro estudio en la enfermedad de Cronh en el colón, se ha descrito que un aumento de la expresión de PKM2 protege contra la apoptosis de células epiteliales y que la activación con TEP46 favorece la muerte celular (Tang et al, 2014).

Por otro lado, en infartos cardiacos o en la disfunción cardiaca causada por el tratamiento de tumores con subinil, se ha descrito un aumento de la expresión de PKM2, poniendo de manifiesto otros procesos que pueden ser regulados por esta proteína (Rees et al, 2015).

Como vemos, PKM2 puede afectar no solo mediante su expresión a patologías, sino que la regulación de su actividad juega un papel importante en las mismas.

5.7. PKM2 en el endotelio.

La mayoría de las referencias dadas en este capítulo acerca de PKM2 provienen de estudios realizados en células tumorales. A pesar de la importancia de la angiogénesis en los procesos cancerígenos, no se ha efectuado ningún estudio en profundidad sobre el papel de PKM2 en células endoteliales.

Hay pocas evidencias sobre el papel de esta proteína en los vasos sanguíneos. En un estudio, se describió la presencia de PKM2 en la sangre, que promovía el crecimiento tumoral y angiogénesis en los tumores (Li et al, 2014), o de la función en una vía de señalización en la que está implicado NF-Kb, en la que la expresión de PKM2 producía más angiogénesis tumoral (Xu et al, 2015). Acerca del rol fisiológico de PKM2, sólo existe algún estudio en el que la interferencia de su expresión disminuye la formación de estructuras tipo capilares en un ensayo in vitro (Boeckel et al, 2016).

No existen evidencias de cómo PKM2 puede regular funciones celulares endoteliales implicadas en angiogénesis. Como se ha descrito anteriormente, el papel de PKM2 en la regulación de la proliferación celular es complejo. En cuanto a la migración celular, existen estudios en células tumorales de que la expresión de PKM2 promueve el movimiento celular (Yang et al, 2015), pero, sin embargo, en otro estudio describen su papel en la inhibición de este proceso (Chen et al, 2015). En cuanto a la regulación de uniones endoteliales o de la vía de Notch-Dll4, no existen evidencias al respecto.

Dada la importancia de PKM2 en patologías, y del papel de la angiogénesis en las mismas, es de interés desentrañar el papel de PKM2 en la angiogénesis fisiológica, para así poder comprender mejor aspectos reguladores que puedan servir para profundizar en la investigación y en el desarrollo de terapias para poder tratar esas patologías.

Objetivos

1. Estudiar la expresión de la enzima glucolítica piruvato quinasa (PKM?) en células endoteliales.
2. Analizar el papel de PKM2 en la regulación de funciones celulares endoteliales claves en angiogénesis, como la proliferación, migración, remodelación de uniones y la formación de estructuras tubulares “in vitro”.
3. Investigar el mecanismo por el cual PKM2 regula dichas funciones endoteliales.
4. Explorar la función de PKM2 en la angiogénesis fisiológica “in vivo”.

Materiales y Métodos

1. Tipos Celulares

1.1. Células endoteliales

Como modelo celular endotelial utilizamos HUVECs (Células endoteliales vasculares humanas de cordón umbilical) obtenidas de la casa comercial Lonza. Las células fueron cultivadas sobre plástico recubierto con una matriz de gelatina (Sigma) al 0,5%, y utilizadas para los experimentos entre los pases tercero y cuarto.

Para el mantenimiento de los cultivos, experimentos bioquímicos y proliferación, se utilizaron placas de mayor tamaño (Falcon), mientras que para los experimentos de imagen y migración fueron utilizadas placas de angiogénesis de 15 pocillos (Ibidi).

Diferentes medios de cultivo fueron utilizados dependiendo del uso que se le fuera a dar a las células. Para el crecimiento y el mantenimiento, fueron crecidas en medio 199 (Lonza) suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB, Gibco), 100U/ml, penicilina (Lonza), 100 mg/ml, estreptomycin (Lonza), 2mM L-Glutamina (Lonza), 10mM hepes (Lonza), y factores de crecimiento endoteliales suplementados con heparina (Promocell). Para experimentos de angiogénesis in vitro, el medio utilizado fue EGM2 (Medio de cultivo endotelial 2) (Promocell).

1.2. Fibroblastos.

Los “Fibroblastos asociados al cáncer” (CAFs) fueron obtenidos de ATTC y cultivados en medio IMDM (Lonza) suplementado con Na-piruvato (Lonza), 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO), 100U/ml, penicilina (Lonza), 100 g/ml, estreptomycin (Lonza), 1mM L-Glutamina (Lonza) y 10mM hepes (Lonza).

2. Métodos de biología celular.

2.1. Tratamientos celulares

Para los tratamientos de las células endoteliales con diversos estímulos, fueron previamente depleccionadas de suero y factores durante al menos tres horas. Por ello, las células fueron cultivadas con medio de cultivo únicamente suplementado con 1% de SFB. Durante todo el tiempo de tratamientos se mantuvo esa concentración.

2.2. Silenciamiento de la expresión de proteínas mediante ARN de interferencia.

El silenciamiento de la expresión de una proteína se realizó mediante la transfección de ARN de interferencia (ARNi) mediante liposomas, que se fusionan con la membrana plasmática y permiten la entrada del ARNi en la célula. Como agente para la formación de los complejos de liposomas se utilizó Lipofectamina RNAimax (ThermoFisher).

En el momento de la transfección, las células se encontraban entre un 70-90 % de confluencia. Preincubamos las células con Optimem (Lonza) sin antibióticos, sin suero, y sin ningún otro factor, durante dos horas previas a la adición de los complejos. La concentración de ARNi final fue 10 nM y el ratio entre ARNi y lipofectamina a la hora de formar los complejos fue de 6 pmoles por cada μl de Lipofectamina RNAimax.

Se dejaron las células con los complejos durante seis horas sin suero, para después añadir suero hasta una concentración de 10%. Los complejos se retiraron al día siguiente, sustituyéndose por medio completo de cultivo.

Los experimentos se realizaron normalmente a las 72 horas de transfección, salvo en algunos casos excepcionales, como en el ensayo con cytodex3 o en los ensayos de proliferación en los que se realizaron incluso a 168 horas post-transfección,

comprobando siempre que el silenciamiento se seguía produciendo en ese tiempo final por expresión de proteína mediante la técnica de Western Blot.

A la hora de realizar tratamientos en varios pocillos, se realizó el silenciamiento en placas de gran tamaño, para después de la sustitución del medio tras la transfección, despegar las células de las placas, contarlas con una cámara de Neubauer, y sembrarla la misma cantidad en pocillos de menor tamaño.

Las secuencias de ARNi utilizadas se muestran en la [Tabla 2](#). Fueron producidas por Thermo Fisher Scientific.

Tabla 2. Secuencias ARNi.

Dianas	Referencia o secuencia
Control células	Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA
Control ratón	Ambion™ In Vivo Negative Control #1 siRNA
PKM2 humana	5' CCAUAAUCGUCCUCACCAA dTdT 3' Silencer™ Select
PKM2 ratón	5' GUGCGAGCCUCCAGUCACU dTdT 3' Ambion™ In Vivo

2.3. Transfección de plásmidos.

La transfección de plásmidos para inducir la expresión de una proteína se realizó mediante liposomas. Para la formación de los complejos de liposomas se utilizó Lipofectamina 2000 (ThermoFisher).

En el momento de la transfección las células se encontraban entre un 70-90 % de confluencia. Preincubamos las células con medio de cultivo Optimem (Lonza) sin antibióticos, sin suero, y sin ningún otro factor, durante dos horas previas a la adición de los complejos. La concentración final de plásmido fue 17 ng por μ l y el ratio entre

plásmido y lipofectamina a la hora de formar los complejos fue de 3 microgramos por cada μl de Lipofectamina 2000.

Tabla 3. Plásmidos utilizados

Construcción	Referencia
PKM2-GFP	Cedido por Axel Ullrich (Department of Molecular Biology, Max-Planck-Institute for Biochemistry, Martinsried, Germany).

Se dejaron las células tratadas con los complejos durante cuatro o cinco horas sin suero, para después retirar el medio de transfección y sustituirlo por medio EGM2, para después ser reemplazado al día siguiente por medio 199. El paso previo por EGM2 mejora sustancialmente la supervivencia de las células al proceso de transfección. Los plásmidos utilizados se muestran en la [Tabla 3](#).

2.4. Transducción con lentivirus.

La transducción de lentivirus para inducir la expresión de una proteína se realizó a una MOI (partículas virales por célula) de 10. Los lentivirus fueron producidos por la unidad de vectores virales de la Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC). Las partículas virales fueron mezcladas con medio completo de cultivo sin antibióticos, para después ser añadidas a las células. Al día siguiente se sustituyó por medio de cultivo completo ([Tabla 4](#)).

Tabla 4. Lentivirus utilizados

Construcción	Referencia
Go-aTeam1-LV	Cedido por Esteban Veiga Chacón del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Madrid. Agradecimiento a Hiroyuki Noji (Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Japan)

3. Ensayos “in vitro”

3.1. Ensayo de migración mediante cierre de heridas en monocapas de HUVECs.

El ensayo de cierre de herida permite determinar la capacidad de las células de migrar, cuando se desplazan a través de una región de la placa de cultivo que no tiene células.

Previamente al ensayo, las células sembradas en días anteriores, se cultivaron en medio sin factores ni suero durante al menos tres horas. Después se practicó una herida en la monocapa confluyente de células endoteliales con una punta de pipeta de 0,2- 10 μ l, recorriendo el pocillo de arriba a abajo. Se lavó el pocillo con medio tamponado de fosfato y sodio (PBS) tres veces, para después añadir medio de cultivo con 5% de suero, para generar el estímulo que provoque que comiencen a migrar.

Los tratamientos fueron añadidos al medio de cultivo en ese momento. En algunos ensayos se bloqueó la proliferación celular preincubando con mitomicina C, una molécula que inhibe la división celular (Schoors and Bruning et al 2015) a una concentración de 2 μ g por ml, al mismo tiempo que eran depleccionadas de suero, y manteniéndola durante todo el ensayo.

Se realizaron fotos mediante microscopia de campo claro al momento de realizar la herida, y posteriormente a las 16 horas. Para estudios de imagen, tras la realización de las fotos, se procedió a fijar las células en paraformaldehído. Para cuantificar la capacidad migratoria de las células, se midió el área sin células en los tiempos iniciales y finales del ensayo, mediante la realización de ROIs (Áreas o regiones de interés), utilizando el software Fiji, siendo la diferencia entre el área final e inicial fue el parámetro a comparar entre las diferentes muestras.

3.2. Ensayos de proliferación celular.

3.2.1. Recuento directo del número de células

Analizamos el crecimiento de las células a lo largo de los días. Para ello se sembró el mismo número de células de cada tipo a analizar. Durante los días sucesivos se procedió a levantar las células de las placas de cultivo, y a contar el número de células mediante la cámara de Neubauer. El medio de cultivo se reemplazó todos los días que duró el experimento.

Este ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, por lo que el número de células iniciales sembradas fue de 3000, alcanzando la confluencia entre 25000-30000 células a los cuatro-cinco días.

3.2.2. Cuantificación de células positivas para Ki67.

Realizamos tinciones con el marcador nuclear de proliferación Ki67 (Scholzen and Gerdes, 2000). Se cuantificó el porcentaje de células positivas para esta proteína, en comparación con el número de células totales presentes en ese campo, gracias al marcaje de núcleos celulares mediante la tinción con Hoechst.

3.3. Ensayos de formación de estructuras tipo capilares en geles de fibrina.

3.3.1. Ensayos con esferoides formados por células.

La formación de esferoides se realizó mediante la técnica de la “gota que cuelga” (Korff et al 1999). Consiste en la colocación de células en gotitas distribuidas por toda la tapa de la placa de cultivo. Posteriormente se coloca la tapa sobre la placa, de tal forma que las células quedan colgando. Por gravedad, las células se acumulan en la parte distal de la gota, formando agregados celulares, denominados esferoides.

Las células se levantaron y se contaron, para así sembrar 650 células por cada gota. Cada gota contenía 20 μ l de medio EGM2, con un 20% de metilcelulosa, que controla la agregación de las células. Las gotas se dejaron durante toda la noche, para que los agregados se formasen. Al día siguiente se recogieron los esferoides y se centrifugaron a 150 g (número de veces la fuerza de la gravedad) durante cinco minutos sin freno.

Los esferoides fueron resuspendidos en medio de formación de esferoides al que se le añadió fibrinógeno (Merk-Millipore) a una concentración final de 2,5 mg por ml. A continuación se combinaron con trombina (Merk-Millipore) a una concentración de 1 unidad de actividad enzimática por ml final, que procesa el fibrinógeno en forma de fibrina, que polimeriza formando un gel.

Las células que forman los esferoides son capaces de avanzar a través del gel, formando estructuras que se asemejan a capilares. Para estimular la formación de estos túbulos, se añadió medio EGM2 que contiene VEGF y FGF2 entre otros factores. Los tratamientos se añadieron en este medio.

Al día siguiente se tomaron fotos en microscopia de campo claro, analizando el número y la longitud de las estructuras mediante el software Fiji, y los geles fueron fijados en paraformaldehído para posteriormente realizar análisis de imagen por fluorescencia.

3.4. Ensayos con esferoides recubiertos por células.

Las estructuras tubulares formadas son más complejas en este ensayo que las obtenidas con la técnica anterior, por lo que se puede estudiar con mayor detalle los procesos reguladores de la angiogénesis, como por ejemplo, las dinámicas de las uniones celulares.

Para realizar este método, utilizamos microesferas de dextrano recubiertas de colágeno, denominadas Cytodex3 (Amersham). Incubamos las bolas con 400 HUVECs por bola, durante al menos 4 horas en medio EGM2. Después se dejaron

durante toda la noche en un pocillo para que las células que han formado agregados se peguen a la placa, quedando las microesferas recubiertas por una monocapa de HUVECs, situación similar a la que ocurre en un vaso sanguíneo.

Al día siguiente se recogieron los esferoides y se incluyeron en geles de fibrina como en el ensayo anterior. Tras una breve incubación con medio EGM2, sobre los geles se sembraron fibroblastos. Los fibroblastos son necesarios para que los túbulos se estabilicen (Nakatsu et al, 2003) En nuestros ensayos usamos CAFs ya que tienen una proliferación lenta, lo que nos permite realizar el ensayo durante todos los días que necesitan las estructuras para formarse correctamente, y a la vez, permite que la mayoría de los nutrientes alcancen las células endoteliales de los esferoides.

Durante los cuatro primeros días, los procesos principales que ocurren son los procesos de selección de las células de la punta y la migración de las mismas. A partir del día quinto se producen los fenómenos de proliferación de las células, y la maduración de las estructuras nacientes. Nosotros desarrollamos nuestro ensayo durante siete días, momento en el que realizamos fotos de microscopía de campo claro, que después analizamos mediante el software Fiji, cuantificando el número de túbulos, y su longitud. Los geles fueron posteriormente fijados para la realización de análisis de imagen.

3.5. Análisis de la integridad de la barrera endotelial. Resistencia eléctrica transendotelial.

La resistencia eléctrica transendotelial es un valor que indica la resistencia que ofrecen las células al paso de la corriente por unos electrodos que están situados en el fondo del pocillo. Según sea la fortaleza de las uniones entre las células, así será la resistencia que presenten al paso de la corriente. Cuanto mayor sea la integridad de la unión, mayor será la resistencia.

Para hacer el análisis, se utilizan unas placas especiales con electrodos de oro repartidos por la base, donde están sembradas las células. Al aplicar el campo eléctrico, se recogen medidas en 10 electrodos distribuidos por el pocillo, y el

software realiza una media de los valores de esos electrodos. Las medidas se realizan a lo largo del tiempo, por lo que se puede analizar la resistencia de forma dinámica.

4. Ensayos *in vivo*: Desarrollo vascular en retinas de ratones en neonatos.

La vascularización de la retina es un proceso angiogénico que tiene lugar durante los 8 primeros días postnatales (Stahl et al, 2010), aunque posteriormente se produce la reorganización de los vasos nacientes hasta que es adulto para la formación de un plexo vascular maduro.

En nuestros ensayos utilizamos ratones C57/BL6. Los animales fueron alimentados ad libitum con una dieta estándar (2018 Teklad global, Harlan Interfauna Ibérica S.L.). El mantenimiento de los animales se realizó siguiendo la normativa internacional. Se realizaron periódicamente informes de seguimiento sanitario, en los que consta la ausencia de organismos patógenos de acuerdo a las recomendaciones de FELASA (Federación of European Laboratory Animal Science Associations).

4.1. Inyección intravitreal

Las inyecciones de ARNi se realizaron a en día 3 postnatal (P3), inyectando 1 µg de ARNi con Lipofectamina RNAimax en una proporción 1:1. En el caso de la administración de otras moléculas, las inyecciones se realizaron a día 5 (P5). El volumen en ambos casos fue de 1 µl. Posteriormente se sacrificaron los ratones a día 6 (P6).

Para realizar las inyecciones, se anestesió a los ratones en frío, para después proceder a la apertura de los párpados, ya que en ese día aún permanecen cerrados. Después se realizaron las inyecciones con una aguja Hamilton. Como controles, siempre se inyectaba el ojo izquierdo con un ARNi control, o con el vehículo en el que iba

disuelta la molécula, mientras que los ojos derechos siempre eran inyectados con el tratamiento.

4.2. Aislamiento de las retinas

Los ojos se enuclearon a P6, y se fijaron en Paraformaldehído (PFA) 2% durante toda la noche. Después de 3 lavados de 10 minutos con PBS con tritón X-100 0,1%, se procedió a la extracción de las retinas. Para ello se realizó una incisión en la pupila con una aguja de tamaño 20G, procediendo después a retirar el epitelio pigmentario de retina y las demás capas exteriores del ojo. Se extrajo posteriormente el cristalino, y se realizaron incisiones en la retina para formar 4 pétalos. Finalmente, con los pétalos extendidos, se procedió a eliminar los vasos sanguíneos hialinos.

Para la extracción de proteínas de retina, esta se realizó sobre ojos sin fijar, con lo que directamente se procedió al aislamiento de la retina tras la enucleación, y se lisaron en solución de lisado RIPA (Tris 50mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1 % Na-deoxicolato 0.5 %, NP40 1%) al que se añadieron inhibidores de fosfatasa y proteasas (Roche).

5. Técnicas de microscopia de fluorescencia.

5.1. Tinciones de inmunofluorescencia.

5.1.1. En células.

Las células fueron fijadas en una solución de PFA al 4% y Sacarosa al 2% en PBS durante 15 minutos, y lavadas tres veces en PBS. Se bloquearon con albúmina sérica de bovino (BSA) al 2% en PBS durante 10 minutos. Después, las células fueron

permeabilizadas durante 10 min con tritón X100 al 0,1% en PBS, para volver a ser bloqueadas durante otros 20 minutos. Todo esto se realizó a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas de interés, diluidos en la solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C.

Después de 3 lavados de 5min en PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo durante 1h a 37°C en cámara húmeda. A continuación se realizaron tres lavados de 5min en PBS y finalmente los cristales fueron montados sobre portaobjetos con medio de montaje FluoromontG (SouthernBiotech).

5.1.2. En geles de fibrina

Los geles fueron fijados en una solución de PFA al 1% con 0,5% de sacarosa en PBS durante 30 minutos, y después lavados en PBS con tritón X100 al 0,1%. Se permeabilizaron y bloquearon durante dos horas a temperatura ambiente en una solución que contenía 2% de BSA, 0,3% de tritón X100, 0,3 M de glicina, 0,2 % de azida sódica, y 1% de suero de cabra en PBS.

Posteriormente, los anticuerpos primarios fueron incubados durante toda la noche a 4°C en solución de permeabilización-bloqueo. Al día siguiente, los geles fueron lavados con PBS Tritón X100 0,1% durante 3 veces de 30 minutos cada una. Se procedió a continuación a realizar una postfijación en PFA 4% con 2% de sacarosa en PBS durante 15 minutos. Tras un lavado, y 30 minutos de incubación con la solución de permeabilización-bloqueo, se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos en esa solución durante toda la noche.

Después de 3 lavados de 30 minutos, los geles fueron montados añadiendo FluoromontG en los pocillos.

5.1.3. En retinas de ratones.

Tras el aislamiento de las retinas, estas fueron bloqueadas-permeabilizadas durante toda la noche a 4°C en una solución compuesta por BSA 2%, suero de cabra al 1%, tritón X100 0,5%, 0,2% deoxicolato, y 0,2% de azida sódica en PBS.

Al día siguiente, fueron añadidos los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo-permeabilización de retinas, e incubados durante toda la noche a 4°C.

A continuación fueron lavadas durante 5 veces de 10 minutos cada una con PBS tritón X100 0,1%, para después ser incubadas con isolectina-B4 de *Griffonia simplicifolia*. Esta molécula se une a las células endoteliales gracias a la elevada expresión de residuos de α -D-galactosa en su membrana, con los que isolectina reacciona específicamente (Laitinen, 1987). La isolectina se diluyó en solución PBLEC, que consiste en 1mM de $MgCl^{2+}$, 1mM de $CaCl^{2+}$ y 0,1 mM de $MnCl^{2+}$ en PBS-Tween20 1% con un PH de 6,8, e incubada durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, las retinas fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos cada vez, e incubadas con los anticuerpos secundarios diluidos en solución de permeabilización-bloqueo de retinas, durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 5 veces durante 10 minutos cada vez, para proceder a su montaje en portaobjetos de microscopia con FluoromontG.

5.2. Microscopia de célula viva.

Para poder visualizar las dinámicas de ciertos procesos celulares, realizamos videos en microscopia de fluorescencia de célula viva Zeiss Z7000 (Carl Zeiss). Durante toda la grabación se mantuvo una temperatura constante de 37°C y 5% de CO₂.

Las imágenes del video fueron tomadas en secciones confocales en el menor tiempo posible entre una y otra. Las longitudes de onda de excitación y emisión se muestran en la [Tabla 5](#) para cada una de las construcciones fluorescentes.

Tabla 5. Longitudes de onda de fluorescencia en microscopia de célula viva.

Construcción	Excitación	Emisión
Go- aTeam1	488	510 y 560
PKM2- GFP	488	510

6. Técnicas Bioquímicas

6.1. Subfraccionamiento de membranas de células endoteliales.

Realizamos esta técnica para separar los distintos compartimentos celulares, y analizar su composición proteica.

En primer lugar se recogieron las células en PBS-EDTA 20mM para luego ser centrifugadas. A continuación, se resuspendieron en una solución hipotónica de 10mM de hepes, 1mM EDTA y 0,25M de sacarosa, en PBS a 7,4 pH. Tras la homogenización de las células mediante una aguja de 16G, el homogenizado resultante se centrifugó a 800g durante 5 minutos, para separar los núcleos y células intactas, que bajan al fondo del tubo, mientras que el resto de compartimentos celulares quedan en el sobrenadante.

Este sobrenadante se centrifugo a 8000g durante 10 minutos para separar las mitocondrias del resto de compartimentos membranales y el citoplasma. Tras recoger el sobrenadante, se procedió a una ultracentrifugación a 200000g para separar las membranas del citoplasma. Retiramos el sobrenadante que contenía el citoplasma, y las membranas totales, en el fondo, fueron resuspendidas en solución de homogenización.

A continuación, se separaron las membranas por densidad en un gradiente de Optiprep (AxisShield). Para ello, se desarrolló un gradiente discontinuo de concentraciones decrecientes de Optiprep, al 30%, 20% y 10% en la solución de homogenización, añadiendo las membranas resuspendidas en la parte superior y ultracentrifugando durante 3 horas a 360000g.

Se recogieron 12 fracciones de menor a mayor densidad, para proceder a la precipitación de proteínas mediante acetona durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron y resuspendieron en solución de homogenización.

6.2. Análisis de la expresión de proteínas mediante Western Blot.

El método del Western Blot permite la identificación de proteínas de un extracto celular o tejido, basándose en la separación de las proteínas de una muestra en función de su tamaño, para posteriormente ser reconocidas mediante la utilización de anticuerpos específicos.

6.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas.

Para la extracción de muestras de forma rutinaria, en células y en tejidos, se utilizó la solución de lisado RIPA (Tris 50mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1 % Na-deoxicolato 0.5 %, NP40 1%) a la que se añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche) utilizando el volumen adecuado dependiendo del tamaño del pocillo. En el caso de los lisados de células, estas fueron previamente lavadas dos veces con PBS a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 13000g a 4°C durante 10 minutos, se recogieron los sobrenadantes y se procedió a la cuantificación de proteínas.

Para ello se utilizó un método colorimétrico basado en el método de BCA (ThermoFisher), en el que los iones de cobre son quelados por la acción de ácido bicínico en presencia de proteínas, formando complejos de color púrpura. Se midió la absorbancia del producto de reacción a 570 nm en un lector de placas. Los

valores de absorbancia de las muestras se compararon con los valores de soluciones de concentración conocida de BSA disuelto en la solución de lisado, con los que desarrolló una recta patrón de concentraciones.

6.2.2. Electroforesis y transferencia.

Se prepararon las muestras para que todas tuvieran la misma cantidad de proteína, para así poder comparar la mayor o menor presencia de nuestra proteína de interés de forma correcta. Las muestras se desnaturalizaron y redujeron en 4% de β -mercaptoetanol, hirviéndolas durante 4 minutos en medio Laemmli (Laemmli 1970), para a continuación, proceder a su separación mediante electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) durante 90 minutos a 130V.

La desnaturalización permite que las proteínas se extiendan, mientras que la reducción rompe los puentes de disulfuro. Además, la solución Laemmli carga negativamente las proteínas, lo que permite que avancen en un campo eléctrico hacia el polo positivo. La velocidad de avance a través de los poros del gel dependerá del tamaño de la proteína, lo que permite que obtengamos un gradiente de proteínas separadas según sus pesos moleculares. Se utilizó un marcador de pesos moleculares (ThermoFisher), consistente en proteínas de peso molecular conocido, marcadas con color azul y rojo, lo que permite identificar las bandas de pesos moleculares en el gel.

Las proteínas se pasaron a una membrana de nitrocelulosa (Biorad), mediante una transferencia en húmedo durante 90 minutos a 390mA. Las membranas se activaron en solución de transferencia con metanol, para permitir que las proteínas se unieran a ellas. Durante la transferencia, las proteínas abandonan el gel siguiendo el campo eléctrico, quedando retenidas en la membrana de nitrocelulosa.

6.2.3. Bloqueo, incubación y revelado.

Las membranas se bloquearon en BSA al 5% durante 1 hora en solución de lavado, para así evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos con la membrana.

Los anticuerpos primarios se diluyeron en la solución de bloqueo a la concentración deseada y se incubaron las membranas con ellos durante toda la noche a 4°C.

El día siguiente, se lavaron las membranas en solución de lavado, para retirar el exceso de anticuerpo unido inespecíficamente. Tras tres lavados de 10 minutos, se incubaron las membranas con anticuerpos secundarios durante 90 minutos a temperatura ambiente. Este anticuerpo está dirigido contra la especie en la que el anticuerpo primario se ha desarrollado, lo que permite aumentar la señal de detección. Tras la incubación, se lavaron las membranas 3 veces 10 minutos en solución de lavado.

A continuación, se revelaron las membranas. El anticuerpo secundario está conjugado con HRP (peroxidasa de rábano), por lo que al añadir un sustrato de esa enzima, luminol, éste es procesado emitiendo luz. Esta luz se visualiza como una banda de color negro a la altura del peso molecular de la proteína que recogemos en el aparato LAS4000. Cuanta mayor sea la cantidad de esa proteína, más intensa será la luz, y más negra e intensa será la banda. Esto nos permite realizar una semicuantificación de la cantidad de nuestra proteína de interés en cada muestra.

7. Técnicas metabólicas.

7.1. Medidas del flujo de la glucólisis por acidificación del medio de cultivo.

La glucólisis se mide mediante la acidificación del medio de cultivo o ECAR, que viene determinado por la excreción de lactato que es producido desde el piruvato de la glucólisis. Otros factores pueden influir en la medida de ECAR, como son la producción de bicarbonato y CO₂ en el ciclo de Krebs en la mitocondria, o incluso el pH mismo del medio puede afectar a la glucólisis. Para evitar que las medidas sean erróneas a consecuencia de esos factores, se añaden inhibidores químicos.

El experimento consiste en someter a las células a un estrés glucolítico, utilizando glucosa, oligomicina y 2-deoxiglucosa (2-DG). La glucosa es el sustrato de la glucolisis, por lo que la diferencia entre la medida del ECAR antes y después de la adición, se considera el ratio de glucolisis. La oligomicina inhibe la ATP sintasa de la mitocondria, haciendo que aumente la glucolisis, por lo que la medida del ECAR en este caso es considerada la reserva glicolítica de las células. Por ultimo 2-DG inhibe la glucolisis, por lo que su adición determina el ECAR no glucolítico. (Teslaa and Teitel 2014). Con todos estos valores, se puede hallar el ECAR resultante. Estos experimentos se realizaron en un instrumento Seahorse XF96.

7.2. Medida de la actividad de la mitocondria mediante el análisis del consumo de oxígeno celular.

La medida del consumo de oxigeno nos indica el funcionamiento de la mitocondria, y su capacidad de producir energía como consecuencia del estrés metabólico celular.

Se estudian dos valores. En un primer lugar analizamos el consumo basal, que es el valor de la respiración en la mitocondria en condiciones normales. Para determinar este valor, hay que eliminar la respiración basal no mitocondrial. Este parámetro se obtiene utilizando el inhibidor de producción de ATP mitocondrial oligomicina, midiendo el consumo de oxígeno tras su adición.

En segundo lugar, se analiza el máximo consumo de oxígeno. Para ello, se añade al medio FCCP (cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon), un protonóforo que colapsa el gradiente de la membrana interna de la mitocondria, haciendo que ésta funcione a su capacidad máxima. Sustrayendo de este valor la respiración no mitocondrial obtenida anteriormente, se halla el valor del máximo consumo de oxígeno. Por último, la capacidad de reserva mitocondrial se determina sustrayendo la respiración basal de la respiración máxima (Rose et al, 2014).

7.3. Medida de ATP.

7.3.1. ATP en fracciones celulares

Decidimos estudiar la energía producida en forma de ATP por las células. Para ello extrajimos fracciones proteicas de tres compartimentos, el total celular, el citoplasma, y una fracción citoesquelética-membranal.

Para extraer el citoplasma, permeabilizamos las células con saponina al 0,01%. Éste, es un detergente suave, que a dicha concentración permite que el contenido del citoplasma de las células se libere al medio, quedando únicamente el citoesqueleto y las membranas. Esta fracción fue extraída con saponina al 0,1% tras la extracción del citoplasma. La fracción total fue obtenida al añadir directamente saponina al 0,1 %.

El ATP fue medido por luminiscencia, con luciferina-luciferasa. La luciferina es procesada por la luciferasa en presencia de ATP, generándose en este proceso luz, que es recogida por un luminómetro. Las medidas fueron corregidas según la concentración de proteínas de cada muestra.

7.3.2. Visualización de ATP a nivel subcelular.

Para analizar el ATP a nivel subcelular, utilizamos la sonda fluorescente GO-aTeam1 (Nakano et al, 2011). Esta sonda utiliza un sistema FRET (Transferencia Resonante de Energía en Fluorescencia), mediante el cual, al excitar un fluoróforo en una longitud de onda, la emisión de ese fluoróforo excita a otro fluoróforo. Dependiendo de lo cercanos que estén los dos fluoróforo, así será la intensidad de la emisión del segundo fluoróforo (también denominado fluoróforo FRET).

En el sistema GO-aTeam1, el primer fluoróforo es GFP (proteína fluorescente verde), que es excitado a una longitud de onda de 488nm, y emite a 510-516 nm. Esta es la longitud de onda de excitación del segundo fluoróforo del sistema, OFP (proteína fluorescente naranja), que emite en 560 nm aproximadamente. La sonda tiene la particularidad de que al unírsele ATP, la estructura se cierra, por lo que los dos

fluoróforos se acercan. Cuanto más ATP, menor será la longitud que los separe, por lo que mayor será la excitación de la OFP, y mayor será la intensidad emitida por el FRET. Para normalizar el ATP con este método, la medida que se utiliza es el ratio OFP/GFP.

La sonda fue introducida en las células endoteliales mediante la transducción de un lentivirus que contenía esta construcción.

7.3.3. Medida de la actividad de la piruvato quinasa.

La actividad de piruvato quinasa fue medida mediante un kit comercial (Biovision). Este método es colorimétrico, acoplando la producción de piruvato y lactato a la oxidación de un compuesto, que produce color. La intensidad de este color se recoge a 590 nm en un espectrofotómetro.

Las medidas realizadas se hicieron en las fracciones citoplasmáticas y citoesqueléticas-membranales, extraídas como se indica en el punto anterior. La cuantificación fue normalizada con la concentración de proteínas de cada muestra.

8. Técnicas de análisis de imagen.

8.1. Análisis en células en monocapa

Estas cuantificaciones fueron realizadas con el software de libre acceso imageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) en máximas proyecciones de imágenes confocales realizadas con el objetivo de 40X en el microscopio confocal Zeiss7000.

8.2. Intensidad media de fluorescencia.

Para analizar la intensidad de fluorescencia media de una proteína a lo largo de la unión, se seleccionaron regiones de interés rectangulares (ROI) en la unión

celular, utilizando como referencia la señal de fluorescencia de alguna proteína de unión, como Ve-cadherina o gamma catenina. La intensidad se calculó como la media de la intensidad de fluorescencia dentro de esa región. Cuando se calculaba la intensidad media total de la célula, se seleccionaba una región de interés alrededor de su perímetro.

8.3. Análisis de las morfologías de uniones endoteliales.

Utilizamos como criterio de morfología la diferenciación entre uniones discontinuas y continuas (Millán et al 2010). Las uniones discontinuas presentan un patrón de Ve-cadherina perpendicular. Es el tipo de uniones que aparecen en el momento inicial en el que se están formando, por lo que representan uniones inmaduras, y activas. Se puede observar que entre los diferentes acúmulos perpendiculares de Ve-cadherina hay un espacio, e incluso en ocasiones las membranas de las células están separadas. Como uniones continuas, establecimos como criterio que las membranas de las células no estuvieran separadas, y que el patrón de Ve-cadherina fuera paralelo a las membranas de las células. Dentro de esta clasificación se encuentran las uniones lineales y las uniones reticulares.

La cuantificación mostrada fue el porcentaje de uniones discontinuas frente al número total de uniones cuantificadas en un campo o foto.

8.4. Análisis en ensayos in vitro de angiogénesis.

8.4.1. Longitud y número de capilares.

El número de estructuras tipo capilares fue cuantificado en imágenes de campo claro de esferoides. Para la cuantificación de la longitud, se seleccionó mediante una línea curva la trayectoria desde el cuerpo del esferoide en el punto desde que sale la estructura, hasta el final de la misma.

8.4.2. Número de filopodias.

Los filopodias fueron cuantificados en fotos confocales realizadas con el objetivo de 63X mediante la tinción de faloidina, que marca F-actina. El número de filopodias fue normalizado frente a la longitud de célula analizada.

8.5. Análisis en retinas

8.5.1. Crecimiento radial.

Los vasos de la retina, crecen desde el nervio óptico hacia la pupila. Cuantificamos la distancia desde el nervio óptico hacia el punto más alejado de crecimiento en cada uno de los lóbulos en los que dividimos la retina. La media entre los valores de distancias de todos los lóbulos analizados es representada como la distancia media de crecimiento radial de esa retina.

8.5.2. Densidad vascular.

La densidad vascular representa el porcentaje de área ocupada por los vasos sanguíneos de la retina en una imagen. Para cuantificarlos se utilizó como referencia la tinción de IsolectinaB4 y se cuantificaron con respecto al área total.

8.5.3. Número de células endoteliales por área vascular.

Se utilizó el marcador endotelial ERG, cuantificándose el número de células positivas por área ocupada por isolectinaB4.

8.5.4. Número de filopodias

El número de filopodias fue cuantificado en fotos confocales realizadas en el objetivo de 63X utilizando el marcador isolectinaB4. Se normalizo el número de filopodias por 100 μm de perímetro celular.

8.4. Análisis del patrón de morfología de uniones mediante el algoritmo de regiones o “Patching algorithm”.

Analizamos la distribución de los tipos de uniones endoteliales, tanto en la retina como en los ensayos de capilares in vitro en microesferas, gracias a este algoritmo en el software Matlab (Mathworks).

Sobre imágenes confocales tomadas con el objetivo de 40X, el programa realiza un umbral de intensidad en el canal de Ve-cadherina. Después, descompone las partes de la imagen que superan el umbral en decenas de pequeñas imágenes. Éstas, muestran una pequeña región con uniones endoteliales.

A continuación se clasifican las imágenes presentadas en dos categorías, uniones activas o inactivas, con tres subcategorías según el grado de uno u otro factor. En total son 6 categorías que van de más activo a menos activo. Las uniones denominadas como activas, son uniones discontinuas, desordenadas, con predominancia de acúmulos de Ve-cadherina incluso dentro de las células. Por el contrario las uniones inactivas son las denominadas como uniones lineales. Las uniones reticulares, en caso de presentarse, al ser una morfología intermedia entre activas e inactivas, fueron clasificadas en las dos categorías centrales, diferenciando entre una u otra dependiendo de las uniones que las acompañaban.

El resultado final es un histograma en el que se representa el porcentaje de imágenes que han sido clasificadas de cada tipo. Además el programa te presenta la imagen original en la que se ha superpuesto sobre la tinción de Ve-cadherina diferentes

colores dependiendo de la categoría asignada a esa porción de imagen; de más a menos inactivo, rojo, naranja, verde claro, verde oscuro, azul claro y azul oscuro. Esta representación permite observar cómo están distribuidas las diferentes regiones de la imagen.

Para concluir, se agrupan las tres categorías activas y las tres categorías inactivas, creando un ratio activo/inactivo, que se compara entre las diferentes muestras.

9. Análisis estadístico.

Cuando se compararon dos grupos de muestras, se utilizó el test de la t de Student de dos colas. Si la varianza entre las muestras era diferente, se realizaba el test de Welch.

En el caso de haber más de dos grupos de muestras se usó el análisis de ANOVA, utilizando el post-test de Sidak para comparar entre parejas.

Si la comparación de grupos de muestras se realizaba en conjuntos agrupados, en los que hay varios tipos de muestra, se realizó el análisis de ANOVA de dos vías.

Los resultados en todos los casos se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM). El software utilizado fue Microsoft Excel y Graph Pad Prisma 7.0.

Para que las diferencias entre muestras fueran consideradas significativas, el p valor del análisis elegido debía de ser $< 0,05$. Los diferentes grados de significación se representaban con diferente número de asteriscos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

10. Anticuerpos y tinciones utilizados

Tabla 6. Anticuerpos y tinciones utilizados

Anticuerpo/tinción primaria	WB	IF	Referencia
PKM2	1:1000	1:100	Cell signaling 4053
PKM1	1:1000		Cell signaling 7067
β -actina	1:5000		SigmaA5441
Ve-cadherina	1:500	1:100	Santa cruz:sc- 6458
Ve-cadherina (TEA1/31)		1:1	Cedido por el laboratorio de Francisco Sanchez-Madrid (CNIC) BD
Ve-cadherina		1:25	Pharmingen:5552 89
Plakoglobina	1:2000	1:100	BD Pharmingen 610254
GM130	1:1000	1:100	BD Pharmingen 610605
Calreticulina	1:1000		Cell signaling 2891
Rho-GDI	1:1000		Santa Cruz Biotec. Sc-360
EEA1	1:1000		BD Pharmingen 610685
GAPDH	1:5000		Sigma:G9545
Isolectina B4		1:100	Vector: B-1205
Ki67		1:10	DAKO IR626
Ki67		1:100	Abcam ab16667
Faloidina			
FITC, Texas Red, Alexa Fluor 647		1:100	Life Technologies

Anticuerpo/tinción secundaria	WB	IF	Referencia
Streptavidina 488		1:200	Life Technologies
Alexa Fluor 488, 568, 594, 647.		1:400	Life Technologies
Hoechst		1:5000	Life Technologies
Anti- conejo/ratón/ cabra	1:5000		Jackson
conjugado con peroxidasa			Immunoresearch Laboratories

Resultados

1. Caracterización de la expresión de las isoformas de piruvato quinasa en células endoteliales.

Debido a las diferencias en la expresión de una u otra de las isoformas de piruvato quinasa de músculo (PKM) dependiendo del órgano o tipo celular, procedimos a analizar los niveles de ambas proteínas en lisados proteicos de monocapas confluentes de HUVECs mediante la técnica de Western Blot, ya que va a ser el modelo celular endotelial que vamos a utilizar durante todo el estudio. Utilizamos como controles positivos lisados de órganos de ratones que expresan preminentemente una u otra isoforma, pulmón para PKM2 y cerebro para PKM1, para así poder realizar una comparación de la expresión en nuestras células.

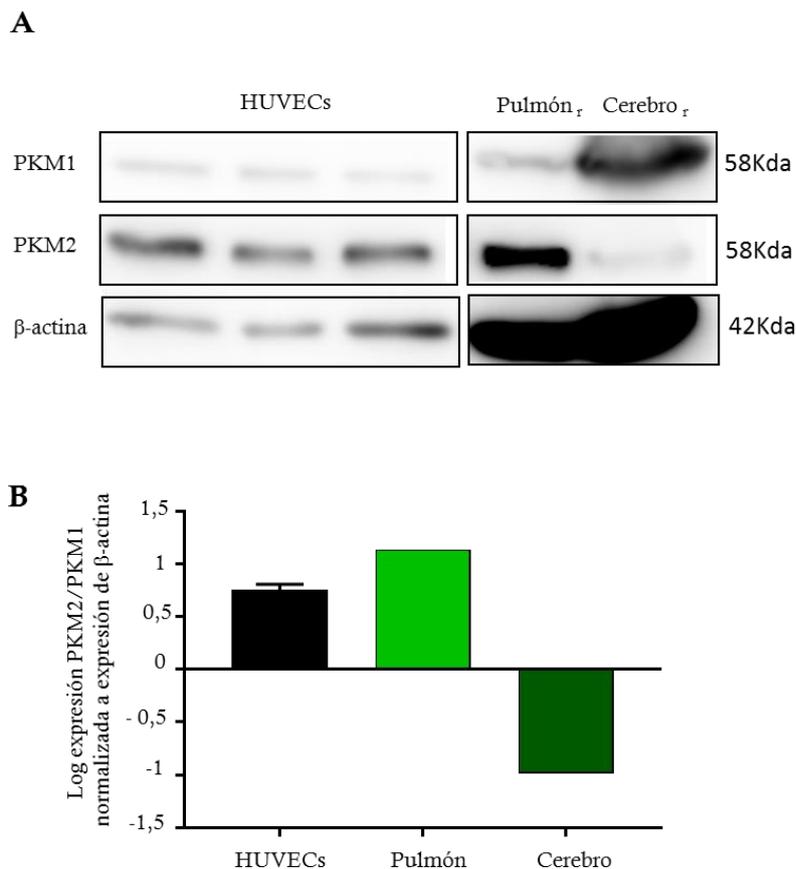


Figura 12. PKM2 es la isoforma expresada preferentemente en HUVECs. A) Western Blot en el que se analiza PKM1 y PKM2. β -actina es usado como control de carga. **B)** Cuantificación del ratio entre las dos isoformas, expresado en logaritmos.

La isoforma preminentemente expresada en HUVECs es PKM2, como se puede observar en la [Figura 12](#), en la que analizamos el ratio PKM2/PKM1 normalizado a la expresión de β -actina, que utilizamos como control de carga.

2. Regulación de los parámetros celulares que regulan la angiogénesis por parte de PKM2.

2.1. Análisis de la proliferación de células endoteliales.

2.1.1. Análisis de la expresión de PKM2 durante los días de cultivo.

Ya que la expresión de muchas proteínas varía dependiendo del momento del cultivo o de la confluencia, procedimos a analizar la expresión de ambas isoformas a lo largo de los días de cultivo, en las diferentes fases de crecimiento que se han descrito en el apartado anterior. Para ello cultivamos las células durante 7 días, extrayendo lisados a día dos, momento en el que las células se encuentran en la fase de crecimiento exponencial, a día cinco en el que el crecimiento ya se ha ralentizado, y a día 7, en el que las células se encuentran prácticamente en estado quiescente.

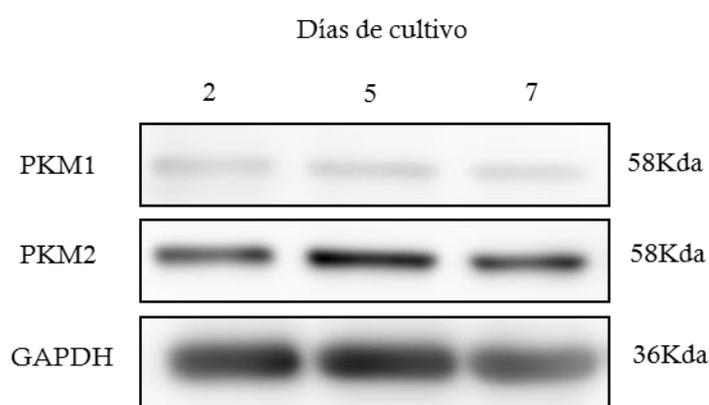


Figura 13. La expresión de PKM2 y PKM1 no varía a lo largo de los días de cultivo. A) Western Blot representativo de expresión de PKM1 y PKM2 en HUVECs a días 2, 5 y 7 de cultivo. GAPDH es utilizado como control de carga.

Analizamos tanto la expresión de PKM1, como de PKM2 mediante Western Blot, utilizando GAPDH como control de carga ([Figura 13](#)).

La expresión de PKM1 y PKM2 no varía a lo largo de los días. PKM2, por lo tanto, se mantiene constante sin que la fase de crecimiento en la que se encuentran las células endoteliales afecte a su expresión.

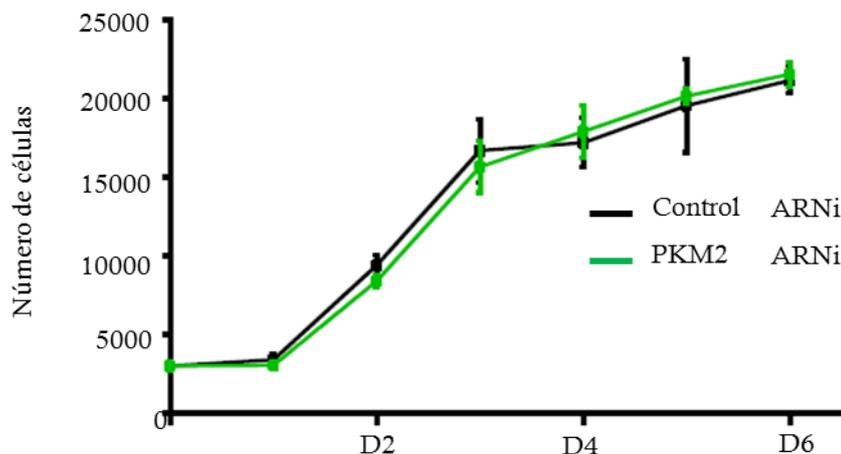
2.1.2. Estudio del número de células en cultivo a lo largo de los días.

Estudiamos entonces el efecto que tiene la expresión de PKM2 en la división de células endoteliales. Para ello interferimos células con un ARN de interferencia específico contra la isoforma M2 de piruvato quinasa. Gran parte de los métodos para medir proliferación celular se basan en la medida de la actividad celular, de tal forma que a mayor actividad, mayor número de células. Debido a que PKM2 es una enzima metabólica, decidimos no utilizar ningún método de este tipo.

Por ello, analizamos la cantidad de HUVECs a lo largo de los días, contando el número presente de células mediante microscopia óptica de campo claro. Simultáneamente, comprobamos que la interferencia se mantenía en el último día de ensayo mediante Western Blot en lisados proteicos de esas células. Además de analizar la eficiencia de interferencia de PKM2, comprobamos que la expresión de PKM1 no variaba ([Figura 14A](#)).

La gráfica representa la dinámica típica de proliferación de células. Durante el primer día el crecimiento es lento debido a la aclimatación de las células a las nuevas condiciones. A continuación las células pasan a una fase de crecimiento exponencial, hasta que alcanzan una confluencia adecuada, momento en el que el crecimiento se ralentiza debido a la inhibición por contacto célula-célula. La interferencia de PKM2 no parece producir efectos en proliferación, ya que no encontramos diferencias entre el número de células a lo largo de los días de cultivo tras la interferencia ([Figura 14B](#)).

A



B

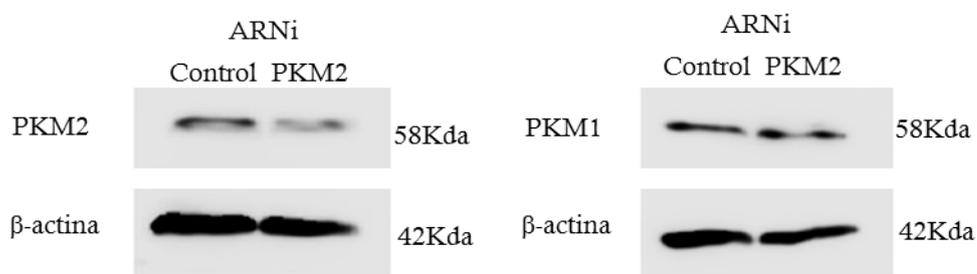


Figura 14. La expresión de PKM2 no influye en la proliferación de células endoteliales. A) Número de HUVECs durante cada uno de los 6 días que duró el experimento. n=4. B) Western Blot representativo de la interferencia de HUVECs con un ARN de interferencia específico contra la isoforma M2 de piruvato quinasa. Se analiza la expresión de PKM1 y PKM2, utilizando como control de carga β -actina. Los lisados pertenecen a pocillos de células endoteliales interferidas que se mantuvieron durante todo el tiempo del experimento de proliferación en las mismas condiciones que las células usadas para el recuento a lo largo de los días.

2.1.3. Análisis de la proliferación mediante el marcador de proliferación Ki67.

Quisimos comprobar si las células con reducida expresión de PKM2 proliferan realmente igual que las células interferidas con el ARNi control. Para ello procedimos a realizar tinciones de inmunofluorescencia en HUVECs subconfluentes interferidas para PKM2, ya que en ese momento aún se encuentran proliferando de

forma exponencial. Utilizamos el marcador de proliferación Ki67, una proteína que se encuentra en el núcleo cuando la cromatina está condensada (Scholzen and Gerdes, 2000), permitiendo diferenciar las células que están en las fases del ciclo de división celular G1, S, G2 o M, en ese momento, las cuales son denominadas células Ki67 positivas (Ki67+).

Como se puede ver en las imágenes, si observamos las células que presentan una menor intensidad de fluorescencia de PKM2, éstas continúan proliferando, (Figura 15A). De hecho al cuantificar el porcentaje de células positivas, era el mismo que en las células interferidas control, como se observa en la Figura 15B.

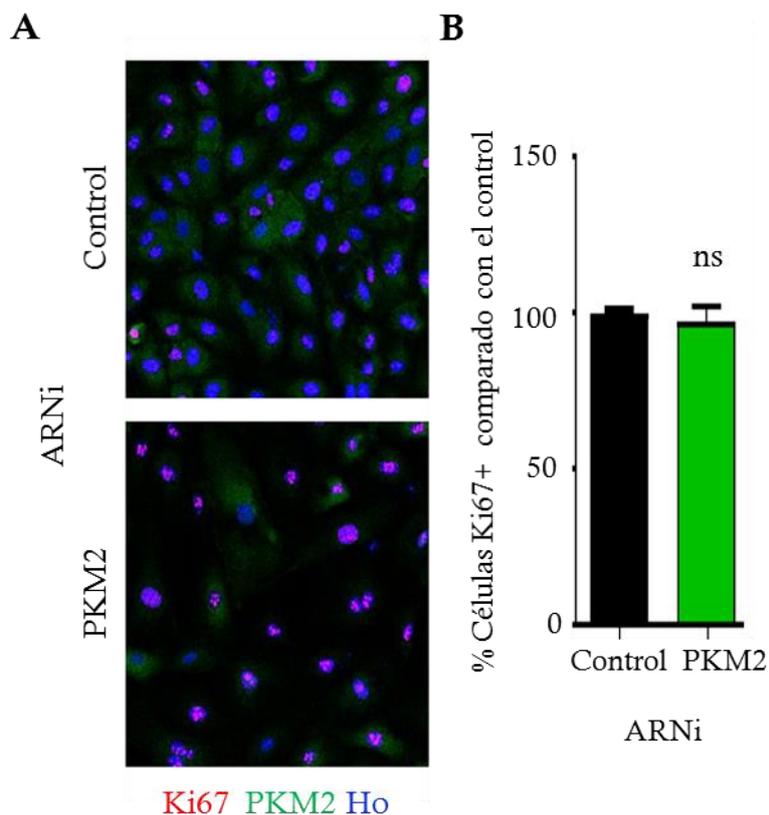


Figura 15. El porcentaje de células positivas para Ki67 no cambia con la interferencia de PKM2. **A)** Imágenes de máximas proyecciones de microscopía confocal de HUVECs interferidas para PKM2. Ki67 (rojo), PKM2 (verde) y Hoechst (azul) son las proteínas analizadas. **B)** Cuantificación del porcentaje de células positivas para Ki67 comparado con el porcentaje en las células interferidas controles. Se realiza el test estadístico “t de student” de dos vías. ns: no significativo. n=3.

2.2. Estudio de la función de PKM2 en la regulación de la capacidad migratoria de las células endoteliales.

Para analizar la capacidad que tienen las células endoteliales para avanzar en una placa de cultivo, utilizamos el ensayo de cierre de herida; esto es, cultivar las células hasta que alcancen la confluencia, para después practicar una incisión con una punta de pipeta en el pocillo. Estimulamos el avance de las HUVECs con 5% de suero, que van ocupando a lo largo de las horas el espacio de la herida hasta cerrarla.

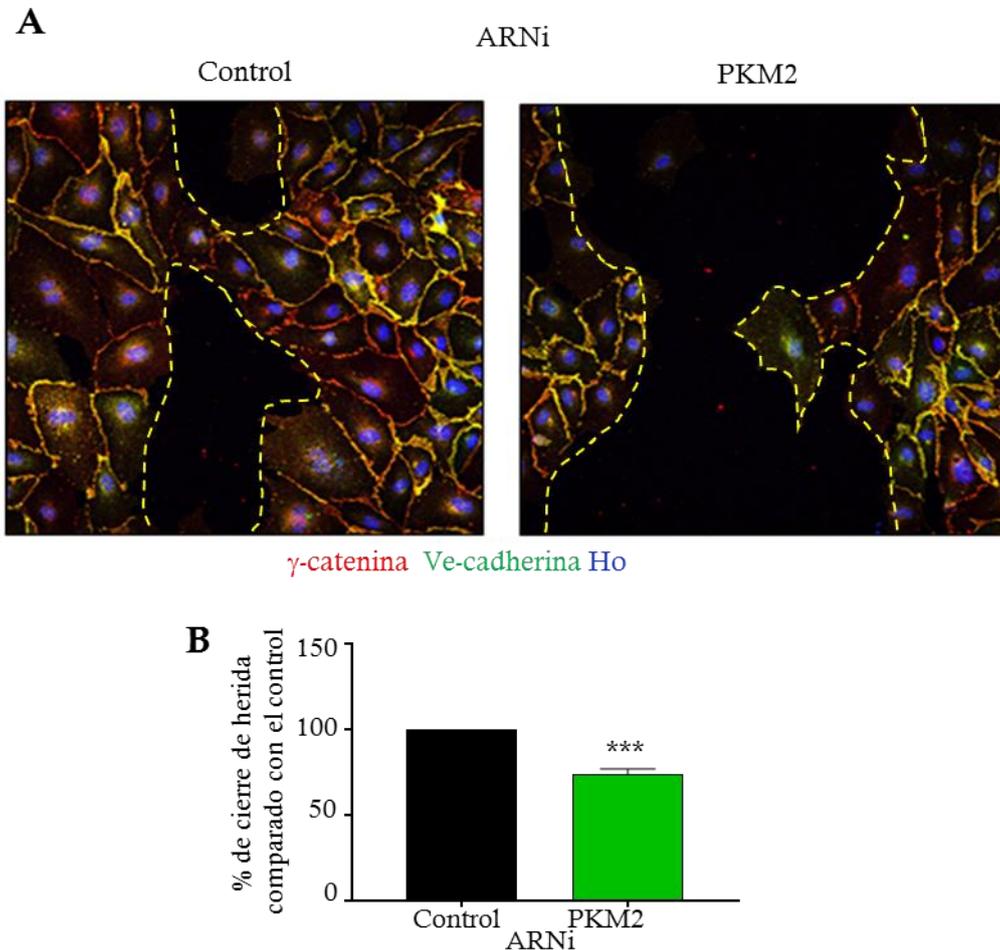


Figura 16. La interferencia de PKM2 provoca defectos en la migración de células endoteliales. A) Imágenes de máximas proyecciones de microscopía confocal del ensayo de cierre de herida, a tiempo final del experimento. En amarillo se delimita el área ocupada por la herida. Ve-cadherina (verde), Plakoglobina (rojo), Hoechst (azul). **B)** Cuantificación del porcentaje de área de la herida que ha sido ocupado debido a la migración de las células endoteliales, normalizado frente al ARNi control. Se utilizó el análisis por t de student pareado. *** $p < 0,001$. $n = 7$.

Tomamos fotos en el momento inicial y tras 16 horas de incubación, cuantificando el porcentaje de área de la herida que ha desaparecido a ese tiempo. Como se observa en la gráfica de resultados, las células interferidas para PKM2 migraron significativamente menos, cerrando menor porcentaje de herida (Figura 16).

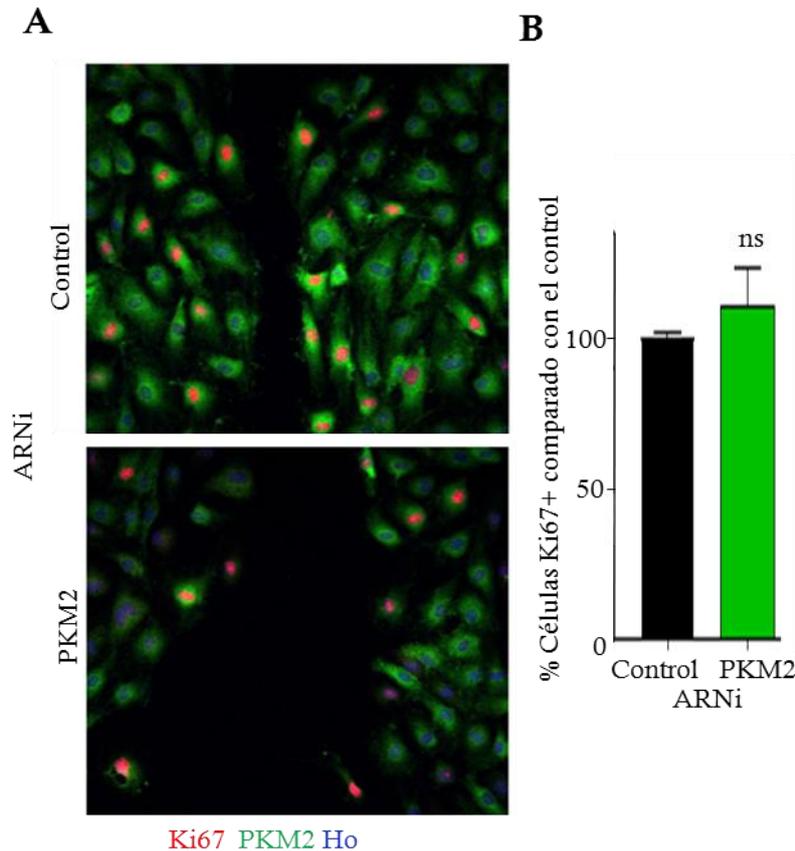


Figura 17. El porcentaje de células Ki67+ no varía en el ensayo de cierre de herida con la interferencia de PKM2. **A)** Imágenes de máximas proyecciones de microscopía confocal realizadas en el ensayo de cierre de herida a tiempo final. Ki67 (rojo), PKM2 (verde), Hoechst (azul). **B)** Cuantificación del porcentaje de células Ki67+. Se realiza el test estadístico t de student de dos vías. ns: no significativo. n=3.

Quisimos excluir la posibilidad de que en este modelo la proliferación de las células estuviera afectando al resultado del ensayo. En primer lugar, analizamos el porcentaje de células proliferando, mediante la tinción por inmunofluorescencia de Ki67 (Figura 17A). No se aprecian diferencias en el porcentaje de células positivas para Ki67 como resultado de la interferencia de la expresión de PKM2 en este ensayo (Figura 17B).

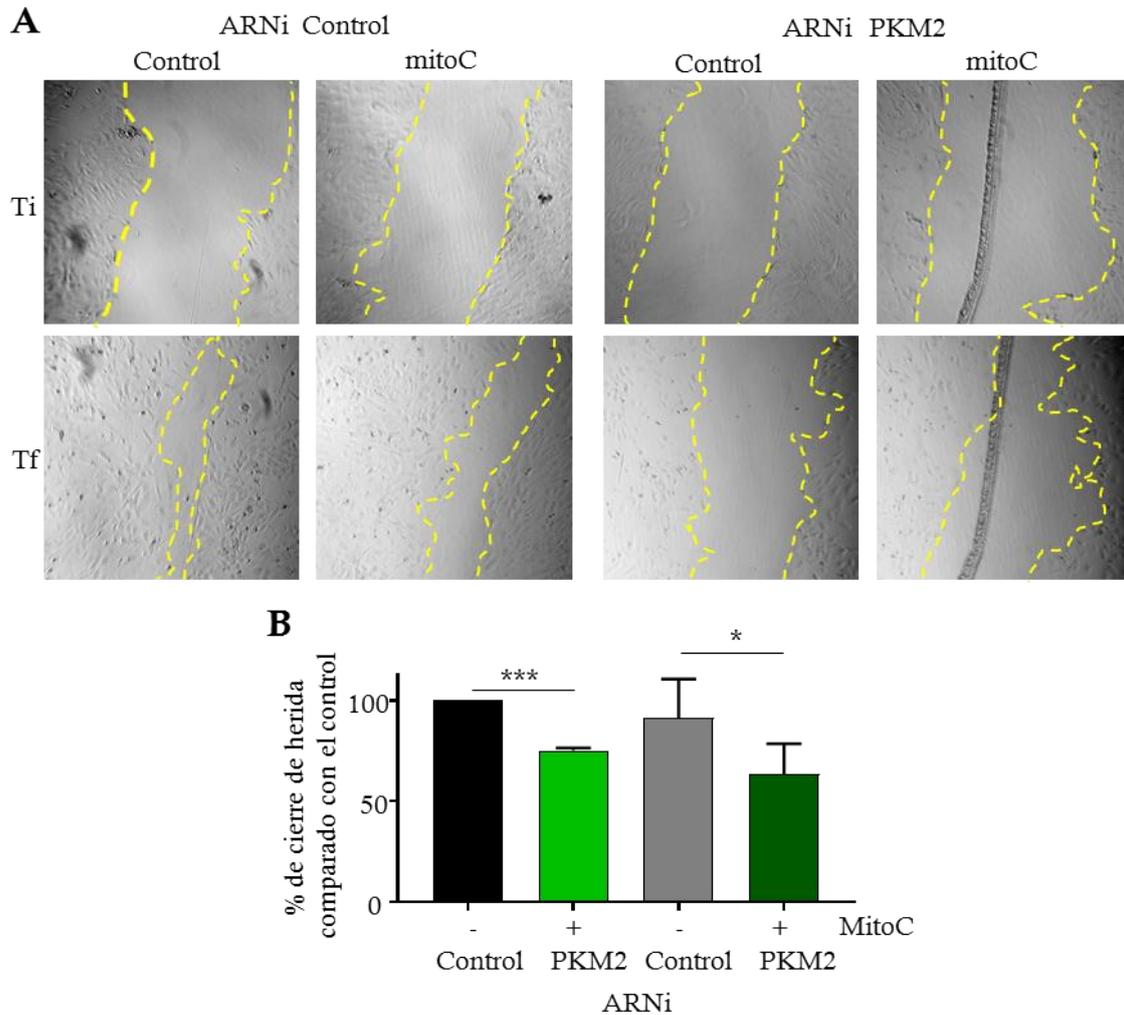


Figura 18. Los defectos en proliferación se mantienen aunque la división de las células endoteliales sea inhibida. A) Imágenes de microscopía óptica de campo claro del ensayo de cierre de herida, a tiempo inicial (Ti) y al tiempo final del experimento (Tf). En amarillo se delimita el área ocupada por la herida. **B)** Resultado de la cuantificación del porcentaje de área de la herida que ha sido ocupado debido a la migración de las células endoteliales, normalizado frente al ARNi control. Se utilizó el análisis de ANOVA con posttest de Sidak. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. $n=4$.

Por otro lado, inhibimos la proliferación celular mediante el pretratamiento de las HUVECs con mitomicina C (2 $\mu\text{g/ml}$), una droga que evita que las células puedan dividirse, para así excluir del ensayo el efecto que pudiera estar teniendo la proliferación de las células. La estimulación con mitomicina C se mantuvo durante todo el ensayo.

El tratamiento con mitomicina C reduce el porcentaje de cierre de herida en ambos tipos de muestra, pero manteniéndose las diferencias en migración entre el grupo control y el grupo interferido para PKM2 (Figura 18).

2.3. Estudio del papel de PKM2 en la regulación de uniones endoteliales.

2.3.1. En células confluentes en condiciones basales.

Analizamos la localización y el patrón de la proteína de uniones adherentes endoteliales Ve-cadherina mediante inmunofluorescencias en células confluentes interferidas con un ARN de interferencia específico de la isoforma M2 de piruvato quinasa. Utilizamos también un anticuerpo específico contra PKM2 para poder discriminar las células interferidas (Figura 19A).

Analizamos la intensidad media a lo largo de las uniones entre células interferidas. Como se puede comprobar en el gráfico, la intensidad de Ve-cadherina era menor cuando PKM2 era interferida (figura 19B). Mediante Western Blot comprobamos que la interferencia de PKM2 no afectaba a los niveles totales de Ve-cadherina, y que la diferencia en intensidad se debe a una menor localización de esta proteína en las uniones endoteliales (Figura 19C y D).

Al analizar la morfología de las uniones celulares de Ve-cadherina, hallamos que el porcentaje de uniones discontinuas en las células interferidas para PKM2, era mayor que en las células interferidas con un ARN de interferencia control. Por lo tanto, la interferencia de PKM2 afecta a la morfología de las uniones endoteliales, presentando una mayor cantidad de uniones inmaduras (Figura 19E).

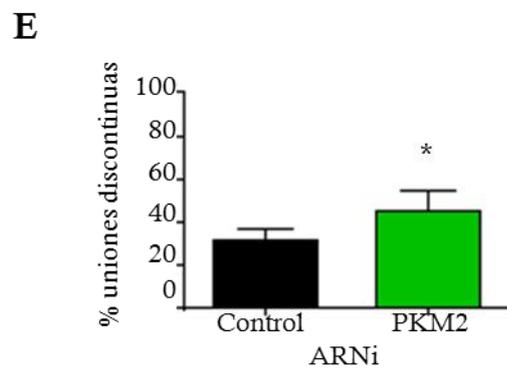
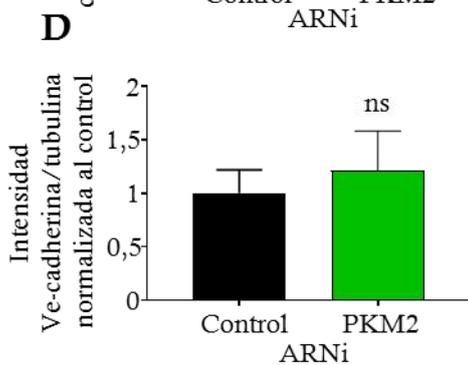
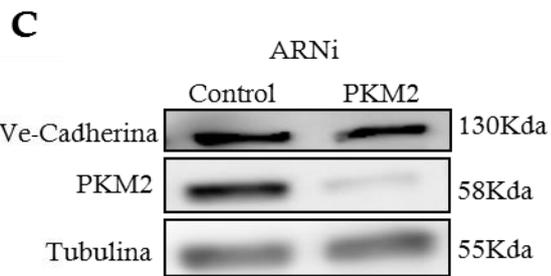
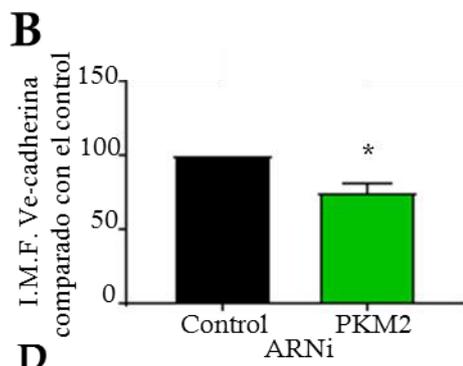
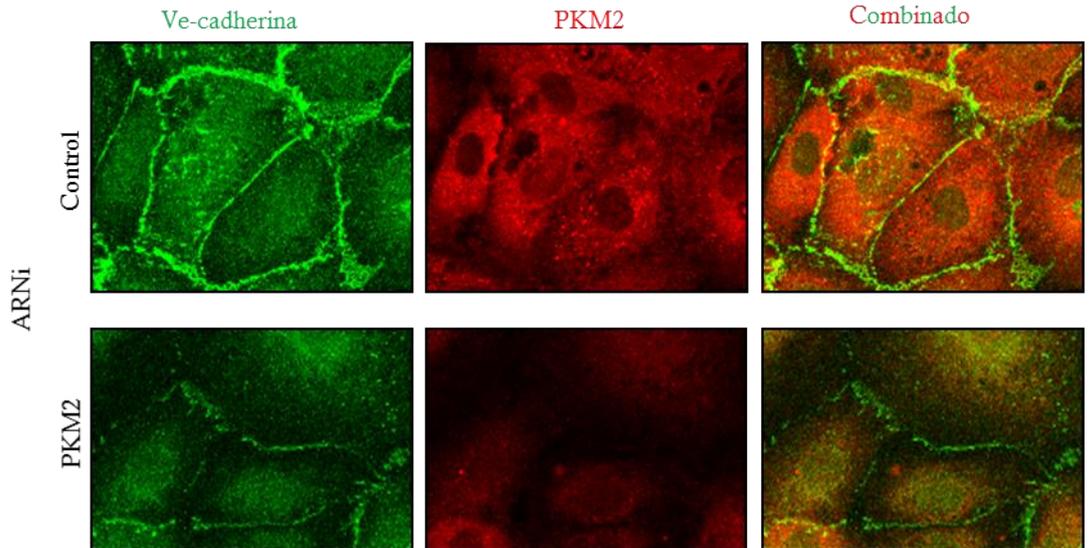


Figura 19. La interferencia de PKM2 afecta a la intensidad en la unión y al patrón de Ve-cadherina en condiciones basales. **A)** Imágenes de máximas proyecciones de microscopia confocal en las que se muestra la tinción de Ve-cadherina (verde) y PKM2 (rojo). **B)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (I.M.F) Ve-cadherina en la unión. Se realizó la estadística mediante t de student pareado. * $p < 0,05$. $n=5$. **C)** Western Blot de la expresión de Ve-cadherina en células interferidas para PKM2. GAPDH fue utilizado como control de carga. **D)** Cuantificación del Western Blot de Ve-cadherina. Se analizó estadísticamente con el test de t de student de dos colas. $n=4$. **E)** Cuantificación del porcentaje de uniones discontinuas. Se analizó estadísticamente con el test de t de student de dos colas. * $p < 0,05$. $n=3$.

2.3.2. En condiciones de remodelado de uniones.

Estudiamos además la morfología e intensidad de Ve-cadherina de las uniones celulares tras el estímulo con esfingosina 1-fosfato. Se ha descrito que este estímulo produce protrusiones de la membrana plasmática y remodelado de las uniones de forma que se reduzcan los espacios entre las células, aumentando el porcentaje de uniones de tipo reticular, que finalmente se transforman en uniones continuas reforzadas (Xu et al, 2007).

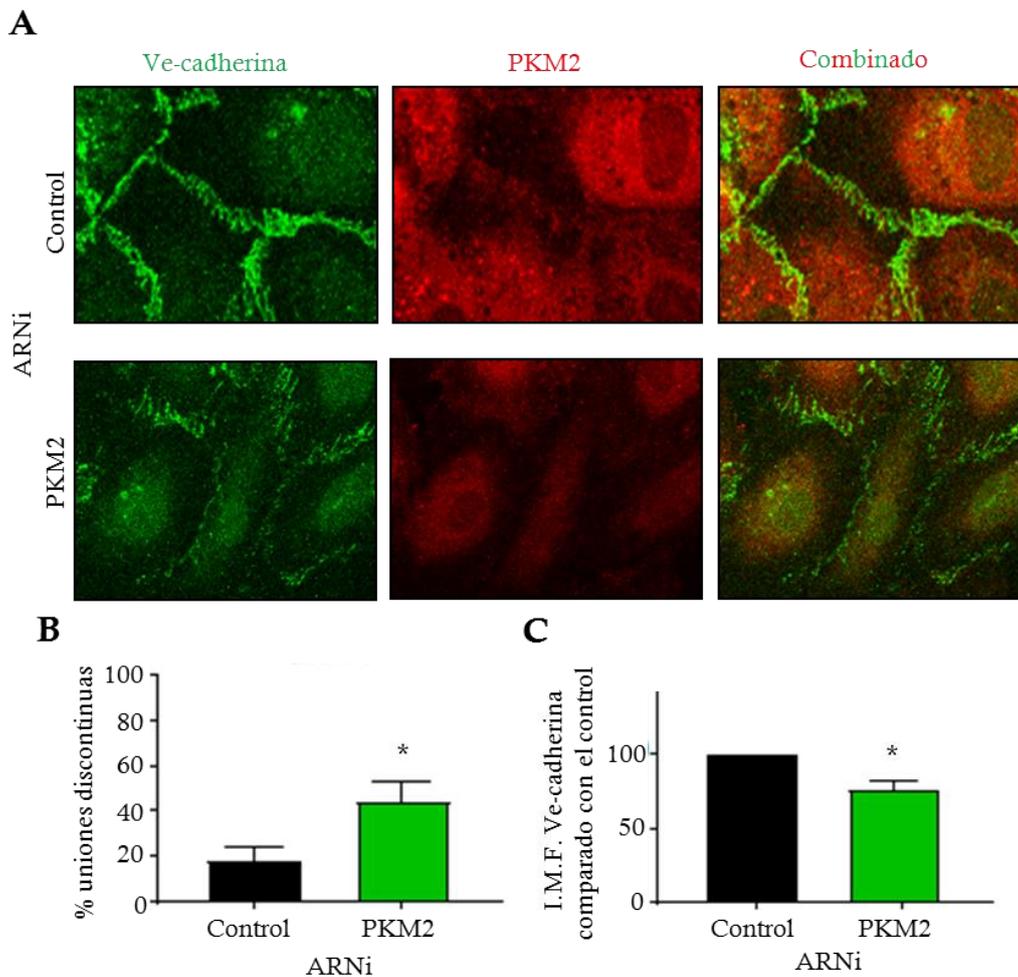


Figura 20. La interferencia de PKM2 afecta a la intensidad y patrón de Ve-cadherina cuando las uniones se remodelan. A) Imágenes de máximas proyecciones de microscopia confocal en las que se muestra la tinción de Ve-cadherina (verde), PKM2 (rojo). **B)** Cuantificación del efecto del tratamiento con S1P (1 μ M, 15 minutos) en el porcentaje de uniones discontinuas. Se analizó estadísticamente con el test de t de student de dos colas. * $p < 0,05$. $n = 4$. **C)** Cuantificación de la intensidad media de Ve-cadherina en la unión en células interferidas para PKM2. Se realizó mediante t de student pareado. * $p < 0,05$. $n = 5$

Para estudiar el efecto de S1P en la morfología de las uniones endoteliales de las células interferidas para PKM2, tratamos las células durante 15 minutos con 1 μ M de S1P (Figura 20A). Cuantificamos el porcentaje de uniones discontinuas, y hallamos que había un mayor porcentaje de uniones de este tipo en las células interferidas (Figura 20B). De hecho, este porcentaje se encontraba en un porcentaje similar a la situación control (40%) (Figura 19D). Además, la intensidad de Ve-cadherina también se encontraba disminuida con respecto a las células control tratadas con S1P.

2.3.3. Análisis de otros marcadores de uniones endoteliales adherentes.

Quisimos comprobar si los defectos en uniones endoteliales afectaban únicamente a Ve-cadherina, o si otras proteínas que se encuentran normalmente en estos complejos también se encontraban afectadas. Plakoglobina, nombre por el que también se conoce a γ -catenina, es una proteína que se recluta a las uniones celulares endoteliales después de que Ve-cadherina se localice allí, aunque puede localizarse allí de forma temprana (Moreno et al, 2014). Una de sus funciones es conferir estabilidad a las uniones que ya han sido formadas (Venkiteswaran et al, 2002).

Al estudiar la intensidad de la fluorescencia de plakoglobina en monocapas confluentes de HUVECs (Figura 21A), observamos que las células interferidas para PKM2 presentaban una intensidad reducida de esta proteína en las uniones (Figura 21B arriba). Esta diferencia era significativa cuando las células eran tratadas con S1P, cuando las uniones celulares se encontraban reorganizándose (Figura 21B abajo). Los defectos en uniones provocados por la interferencia de PKM2 parecen afectar a todos sus componentes.

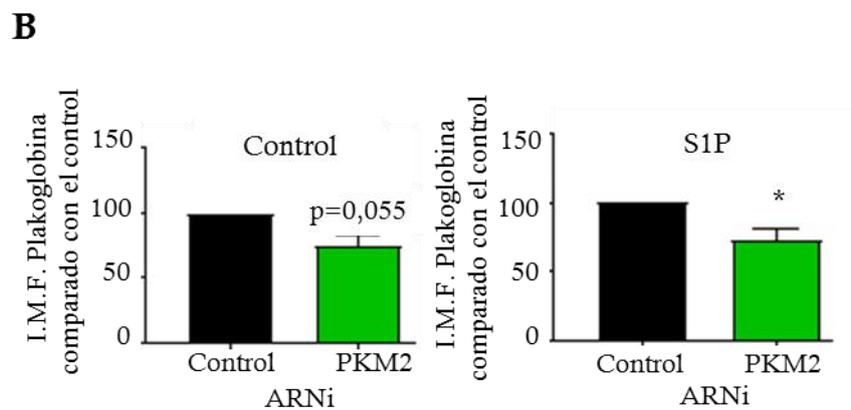
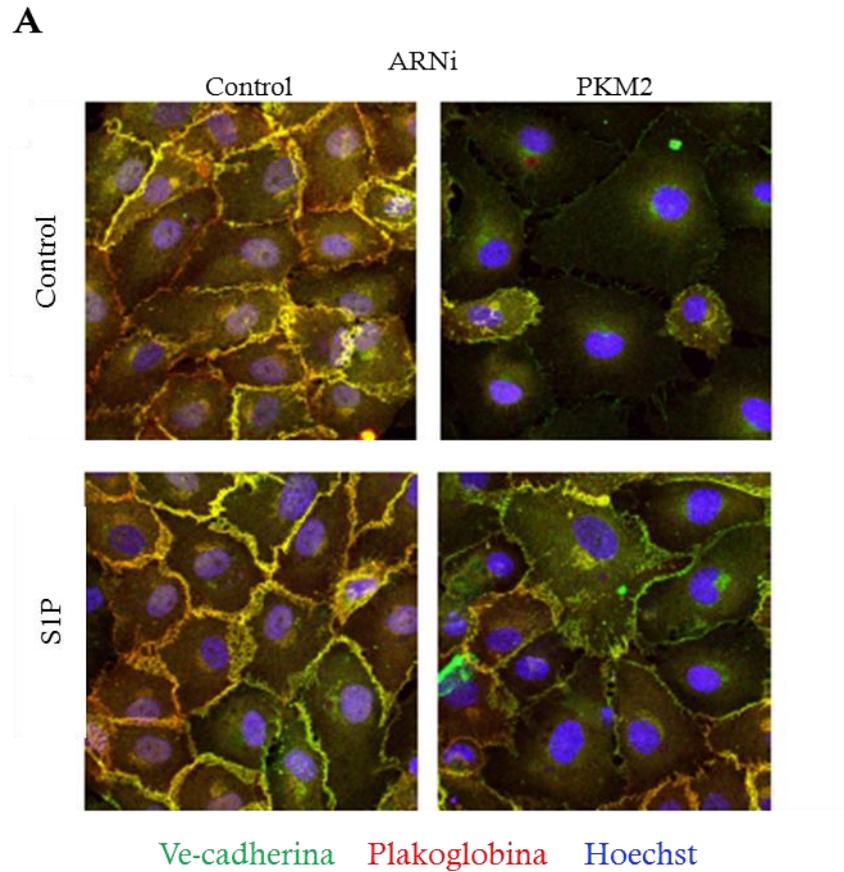


Figura 21. La intensidad de γ -catenina disminuye con la interferencia de PKM2. A) Imágenes de máximas proyecciones de microscopia confocal en las que se muestra la tinción de Ve-cadherina (verde), gamma catenina (rojo) y Hoechst (azul). B) Cuantificación en células no tratadas o en células tratadas en las que se analiza el efecto del tratamiento con SIP (1 μ M 15 min) en la intensidad de gamma catenina en las uniones endoteliales. Se analizó estadísticamente con el test de t de student de dos colas. * $p<0,05$. $n=3$.

2.3.4. Estudio de la función de PKM2 en la integridad de la barrera endotelial.

Dado que las células endoteliales presentan un mayor porcentaje de uniones discontinuas, nos propusimos analizar cuál es el impacto funcional que provoca este defecto. Para ello, analizamos la integridad de la barrera endotelial mediante el estudio de la resistencia eléctrica transendotelial o TEER. Cuanto mayor es la fortaleza de las uniones de la monocapa de HUVECs, mayor es la resistencia que oponen al paso de la electricidad por los electrodos que se encuentran en el fondo del pocillo donde están sembradas las células. Por lo tanto, este es un parámetro que nos indica el estado en el que se encuentra la barrera que forman las células endoteliales, una función fundamental de las mismas.

La morfología de las uniones endoteliales afecta a esta resistencia, como se ha explicado en la introducción. Estímulos que favorecen un incremento en el porcentaje de uniones discontinuas, disminuyen los valores del TEER. En cambio, estímulos que favorecen la presencia de uniones continuas o reticulares, provocan un aumento de este valor. Por ello, decidimos utilizar el tratamiento con esfingosina-1-fosfato, dado que como está descrito en la literatura, provoca un aumento del TEER en células endoteliales cuando es usado en bajas concentraciones (1 μ M).

Para estudiar el efecto de la interferencia de PKM2 en la resistencia eléctrica transendotelial, analizamos los valores de TEER a lo largo del tiempo. Después de un tiempo en el que la señal se equilibra, añadimos S1P. Para cuantificar el efecto de PKM2, medimos el cambio máximo de aumento en los valores del TEER con respecto a la situación inicial antes de añadir el estímulo. Para explicar mejor los resultados, denominaremos a las células interferidas con el ARNi control “células control” y las interferidas “células interferidas para PKM2”, mientras que si han recibido el estímulo de S1P se denominaran como “tratadas”, y si no, “no tratadas”. Los resultados son normalizados al valor del tiempo inicial (Figura 22A).

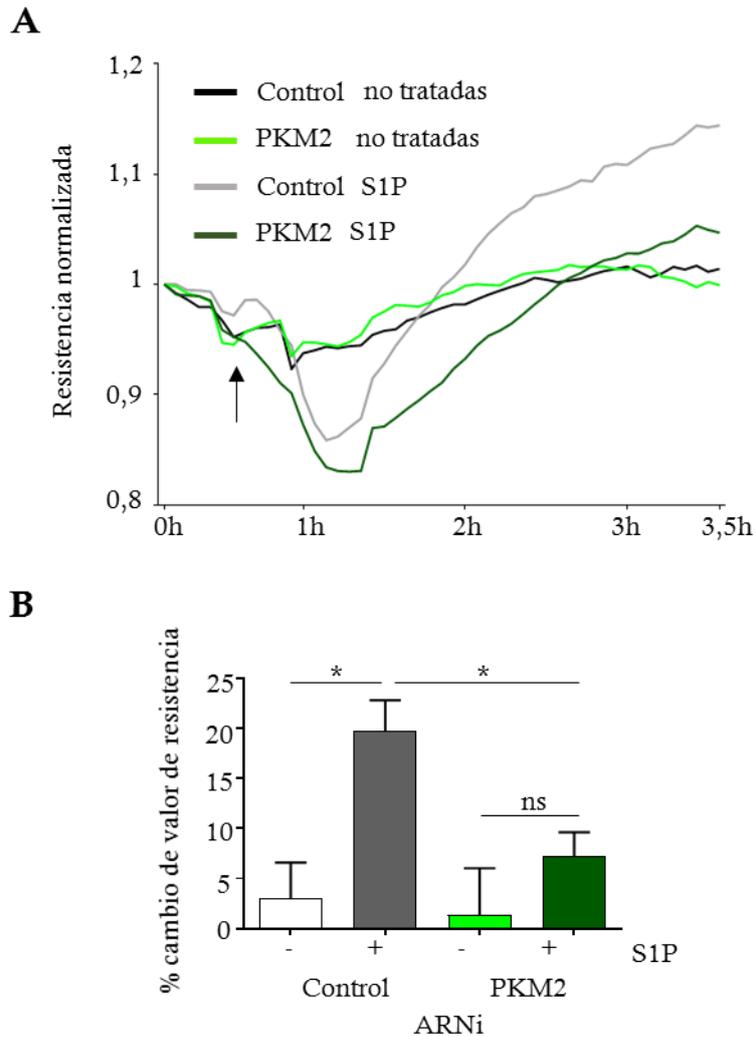


Figura 22. La expresión de PKM2 afecta a la regulación de la barrera endotelial. **A)** Gráfico en el que se muestra la evolución de la resistencia transendotelial a lo largo del tiempo. El momento en el que se añade el estímulo (S1P 1 μ M), se señala con una flecha. Células control no tratadas (línea negra), células control tratadas (línea gris), células interferidas para PKM2 (línea verde clara), células interferidas para PKM2 tratadas (línea verde oscura). El tiempo viene representado en horas en el eje horizontal. **B)** Cuantificación del porcentaje de cambio en los valores del TEER entre el valor del momento en el que se añadió S1P, y el valor máximo. Se realizó el análisis de ANOVA, con posttest de Sidak para comparar parejas de muestras. * $p < 0,05$. $n = 3$.

Así, las células no tratadas, tanto en los controles, como las interferidas para PKM2, no presentan apenas diferencia en el porcentaje de cambio del TEER con respecto al tiempo inicial. Las células control, tratadas con S1P presentaron un aumento significativo del cambio en los valores del TEER desde el momento anterior tras añadir el estímulo al medio de cultivo, con respecto a las células controles no

tratadas. Este cambio fue mucho menor en las células interferidas para PKM2. De hecho, en este caso las diferencias no resultaron significativas entre tratadas y no tratadas (Figura 22B).

Al comparar las células control con las interferidas para PKM2, cuando eran tratadas con S1P, hallamos que las diferencias en el porcentaje de cambio de la resistencia eléctrica transendotelial era significativamente menor en las células interferidas para PKM2.

Por lo tanto, concluimos que PKM2 afecta al funcionamiento de la barrera endotelial.

2.3.5. Estudio de las uniones endoteliales en el ensayo de migración por cierre de herida en células interferidas para PKM2.

2.3.5.1. Análisis de la morfología de las uniones endoteliales.

Ya que habíamos observado que las células interferidas para PKM2 presentaban defectos en su capacidad migratoria, quisimos comprobar si las uniones endoteliales se encontraban afectadas en este tipo de ensayo, dado que es una situación más dinámica que las condiciones de cultivo de monocapas confluentes en las que se realizaron los experimentos anteriores.

Realizamos inmunofluorescencias en las que analizamos el patrón de Ve-cadherina a tiempo final del ensayo (Figura 23A). La cuantificación del porcentaje de uniones endoteliales discontinuas reveló que la interferencia de PKM2 aumentaba significativamente su porcentaje en este ensayo (Figura 23B).

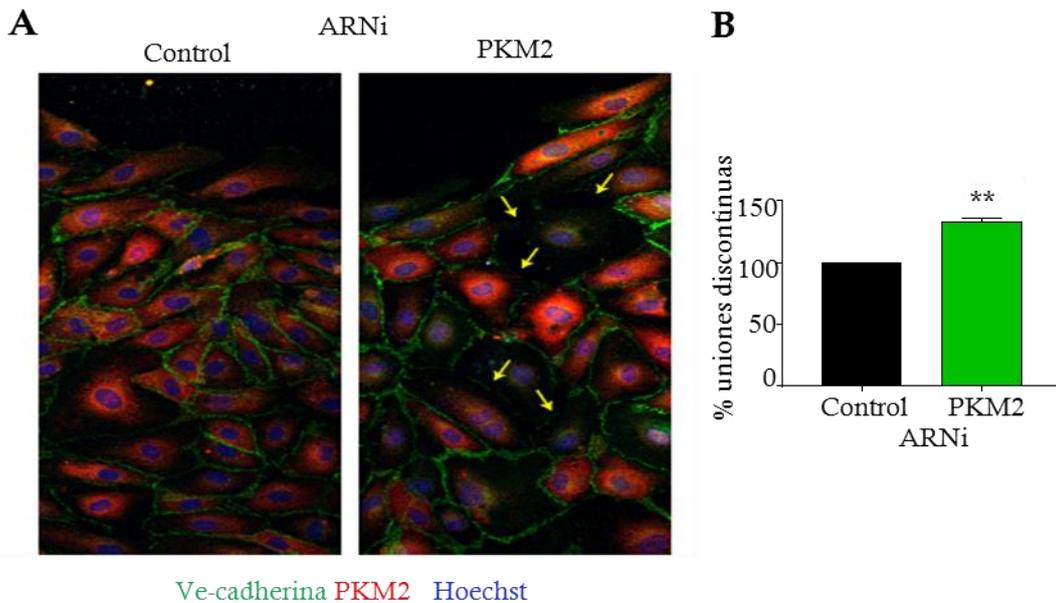


Figura 23. Las células interferidas para PKM2 presentan defectos en la morfología de la unión cuando están migrando. **A)** Imágenes de microscopía confocal de máximas proyecciones de células migrando en el ensayo de cierre de herida, en las que se muestra la tinción de Ve-cadherina (verde), PKM2 (rojo) y Hoechst (azul). Las flechas amarillas señalan uniones irregulares entre células que presentan una intensidad de fluorescencia muy baja correspondiente a la señal de PKM2. **B)** Cuantificación del porcentaje de uniones discontinuas en este ensayo. Se analizó estadísticamente con el test de t de student de dos colas. * $p < 0,05$. $n = 4$.

Realizamos además un estudio complementario de las uniones, mediante el análisis de la morfología de Ve-cadherina con el algoritmo del patrón de morfología de regiones (Patching algorithm) (Bentley et al, 2014), que clasifica las uniones en 6 categorías, a las que se otorga un color diferente dependiendo de si son más activas o irregulares (Figura 24A y B), o más continuas y regulares. Se puede observar que la curva de clasificación de patrones de morfología de uniones se encuentra desplazada hacia la izquierda, es decir, hacia un mayor porcentaje de uniones más irregulares (Figura 24C). Agrupamos las tres categorías activas, y las tres inactivas, hallando el ratio activo/inactivo, comprobando que el efecto de la interferencia de PKM2 producía un incremento de este valor, aunque no llegaba a ser significativo (Figura 24D).

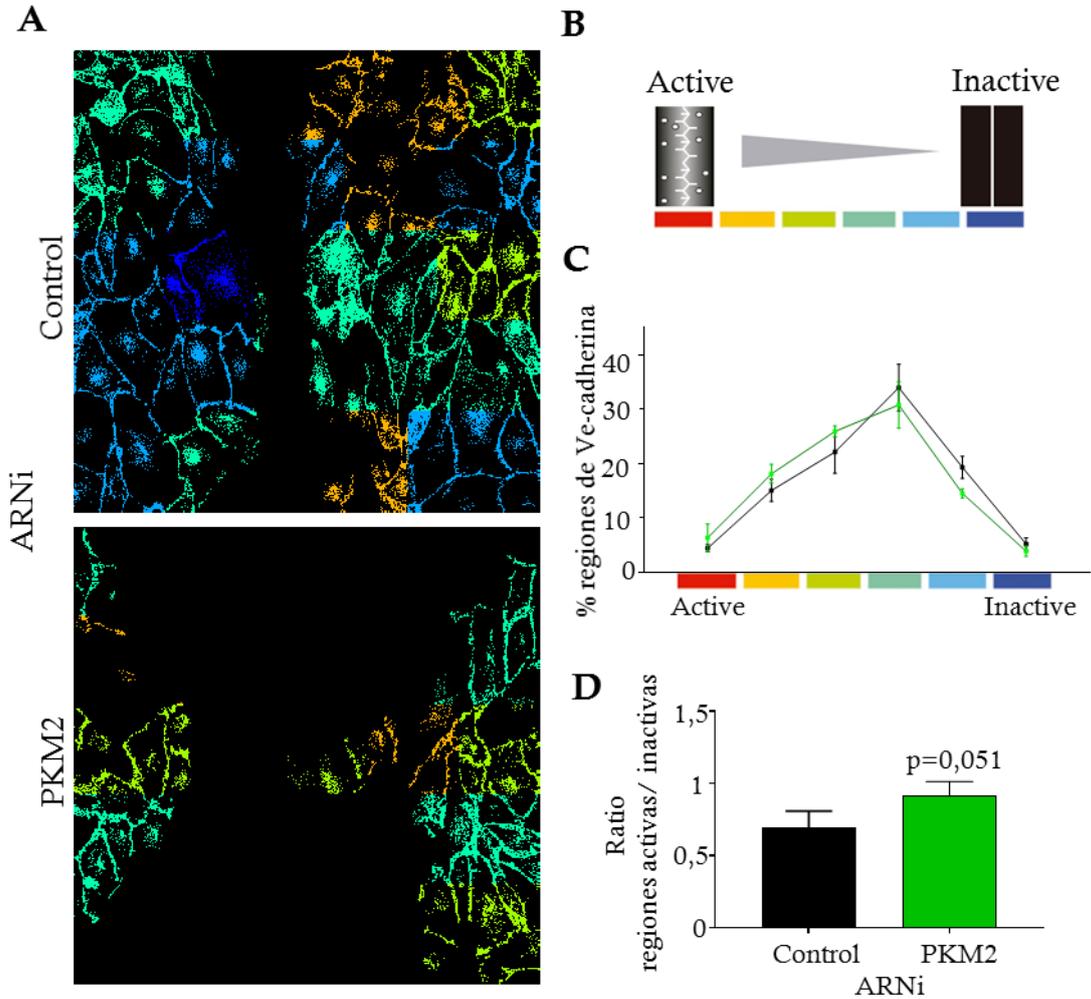


Figura 24. El patrón de morfología de Ve-cadherina en células interferidas para PKM2 se encuentra desplazado hacia las uniones activas. **A)** Imágenes de microscopía confocal de máximas proyecciones de células migrando en el ensayo de cierre de herida, en las que se muestra la representación del patrón de clasificación. **B)** Cuantificación de la clasificación del tipo de patrón de Ve-cadherina. **C)** Cuantificación del porcentaje de uniones activas/inactivas. Se analizó estadísticamente con el test de t de student de dos colas. n=4.

2.3.5.2. Análisis de la orientación de las células endoteliales durante la migración colectiva.

Recientemente se ha descrito la importancia de la morfología de las uniones endoteliales en la migración colectiva, ya que las células endoteliales migran colectivamente orientadas hacia la herida gracias a la diferente distribución de la

morfología de sus uniones celulares (Hayer et al, 2016). Por ello, quisimos comprobar si el hecho de que las uniones celulares estuvieran afectadas en las células interferidas para PKM2, pudiera hacer que las HUVECs se orientasen de forma errónea en dirección a la herida, y por tanto se movieran de forma equivocada en dirección a la misma.

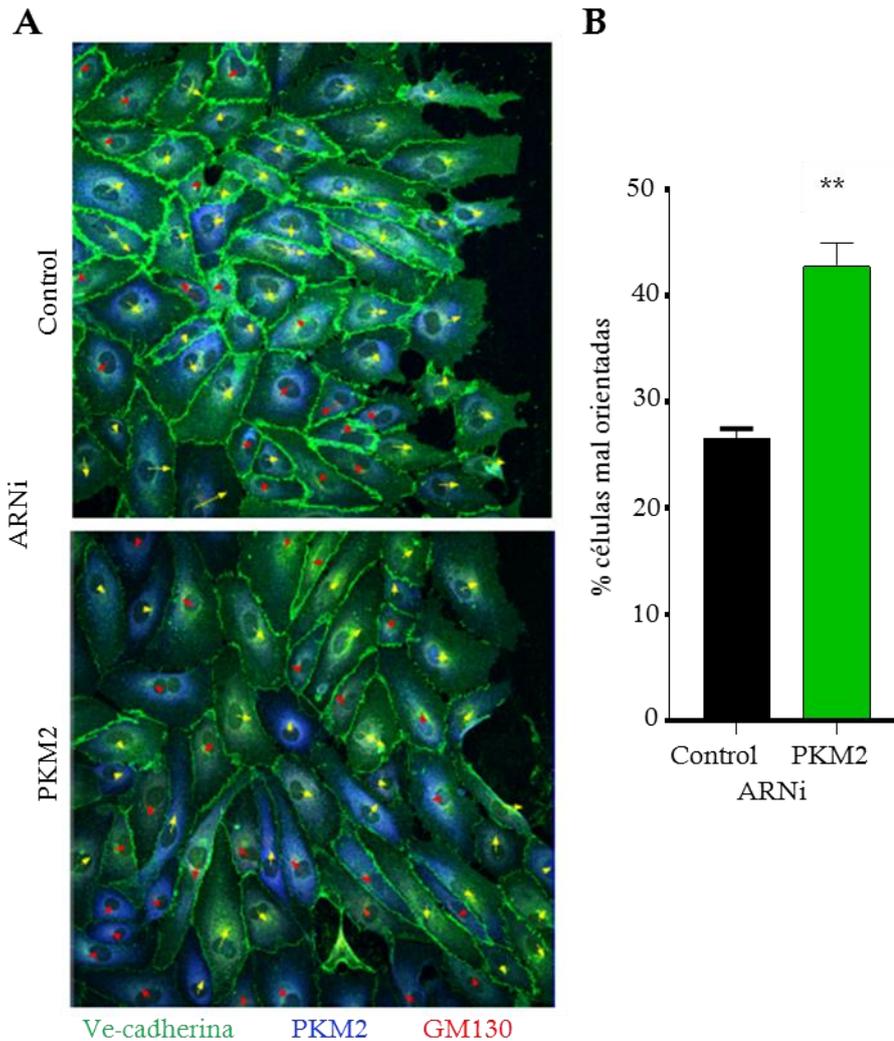


Figura 25. Las células interferidas para PKM2 se orientan de forma equivocada en la migración colectiva. A) Imágenes de máximas proyecciones de microscopía confocal de células migrando en el ensayo de cierre de herida, en las que se muestra la tinción de Ve-cadherina (verde), PKM2 (azul) y GM130 (rojo). **B)** Cuantificación del porcentaje células mal orientadas. Se analizó estadísticamente con el test de t de student de dos colas. ** $p < 0,01$. $n = 3$.

Para discriminar la orientación de las células, utilizamos GM130, marcador del aparato de Golgi, ya que se ha descrito que cuando las células en migración se orientan, este orgánulo se posiciona en la región anterior al núcleo. Así, las células se encuentran direccionadas hacia donde se localiza el Golgi (Millarte and Farhan, 2012).

Clasificamos las células que tenían configurado el Golgi en los 180° en dirección a la herida, como células “bien orientadas”, marcando esa orientación con flecha amarilla. Por otro lado, las HUVECs en las que el Golgi se orientaba en los 180° grados contrarios a la herida, o que no presentaban el orgánulo polarizado, fueron calificadas como de “orientación equivocada” y marcadas con flecha roja.

Como se observa en el gráfico, hallamos que había un porcentaje significativamente mayor de células mal orientadas en las células interferidas para PKM2 (*Figura 25*).

Como resumen de este bloque, podemos observar que existe un papel de PKM2 en la regulación de las uniones endoteliales y en la migración de las células endoteliales, proceso que puede estar afectado a su vez por la deficiencia en la regulación de las uniones. Por otro lado, no observamos que la proliferación se encontrara afectada.

2.4. Estudio de la función de PKM2 en la formación de estructuras tipo capilares in vitro.

2.4.1. Formación de estructuras tipo capilares en esferoides de HUVECs embebidos en geles de fibrina.

Todas las funciones que hemos analizado en el apartado anterior se realizaron en células endoteliales en cultivo. Sin embargo, es necesario el estudio de estas funciones en un modelo que se asemeje a lo que ocurre en la angiogénesis. Utilizamos en primer lugar un modelo sencillo, que permite realizar un estudio preliminar de la capacidad de las células endoteliales de formar estructuras tubulares a partir de esferoides embebidos en geles de fibrina.

microscopia de campo claro de los esferoides, para después fijarlos para proceder a analizar otros parámetros por inmunofluorescencia.

En primer lugar, podemos observar por inmunofluorescencia cómo los esferoides interferidos para PKM2 presentan una menor intensidad de fluorescencia de PKM2 que los controles (Figura 26A).

Posteriormente, analizamos el número y la extensión de las estructuras tipo capilares formadas, hallando que las microesferas generadas a partir de células interferidas para PKM2, presentaban menor número de estas estructuras, y que eran de menor extensión que en microesferas provenientes de células interferidas con un ARNi control (Figura 26B).

2.4.2. Formación de estructuras tipo capilares en microesferas recubiertas de HUVECs embebidas en geles de fibrina.

Una vez que comprobamos que PKM2 tiene un papel en la formación de estructuras tipo capilares, procedimos a utilizar un modelo más sofisticado para poder analizar en más detalle los parámetros celulares que afectan a la angiogénesis. Este modelo consiste en bolas de dextrano, recubiertas de colágeno, a las que las células se adhieren formando una monocapa, que es una situación similar a como se encuentran las células endoteliales en los vasos. En cambio, en el modelo de esferoides de células endoteliales, todas ellas se encontraban agrupadas en una bola, situación que no se produce fisiológicamente. Por otro lado, es un modelo mucho más lento, ya que requiere de varios días para conseguir que se seleccionen las células de la punta, y que estas comiencen a migrar. Es a su vez más complejo, ya que se dan procesos como una correcta formación de lumen, reestructuración de uniones endoteliales y proliferación de las células de la estructura naciente (Nakatsu et al 2003).

En primer lugar, comprobamos si la interferencia de PKM2 afectaba en este modelo de la misma manera que en el modelo de esferoides de células a la formación de estructuras tubulares. Así, al cuantificar el número y la longitud de estructuras tipo capilares a los 7 días, hallamos que había un número significativamente menor, y que eran además de menor longitud media (Figura 27).

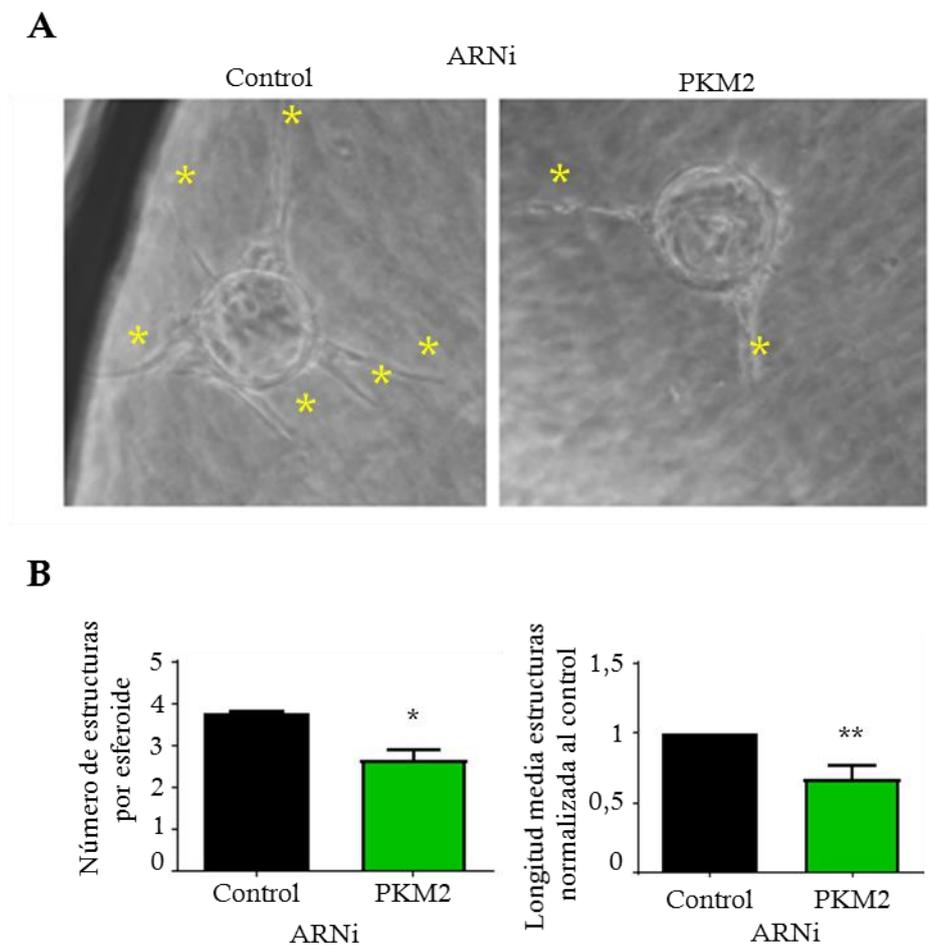


Figura 27. Las microesferas recubiertas de HUVECs interferidas para PKM2 producen menos estructuras tipo capilares y de menor longitud. A) Imágenes de microscopia de campo claro, en las que se observan las estructuras tubulares (señaladas con flechas), saliendo del esferoide. **B)** Cuantificación del número de estructuras por esferoide (izquierda), y de su longitud media (derecha), esta última normalizada frente a la longitud media en el esferoide control. Se realizaron análisis estadísticos mediante el test de la t de student de dos colas y pareado para la longitud. * $p < 0,05$; ** $p > 0,01$. $n = 4$.

Al realizarse este ensayo durante 7 días, comprobamos si la interferencia de PKM2 se mantenía durante todo este tiempo. Al final del ensayo extrajimos proteínas de células que habían sobrado después de recubrir las cytodex3 con HUVECs, y habían sido sembradas, para analizar la expresión de PKM2 mediante Western Blot. La expresión de PKM2 seguía estando reducida en las células interferidas para PKM2 (Figura 28A). Además, analizamos la interferencia mediante inmunofluorescencia. Como se puede apreciar en la (Figura 28B), la intensidad de la fluorescencia en las estructuras tipos capilares de las células interferidas para PKM2 es menor que en las células interferidas control.

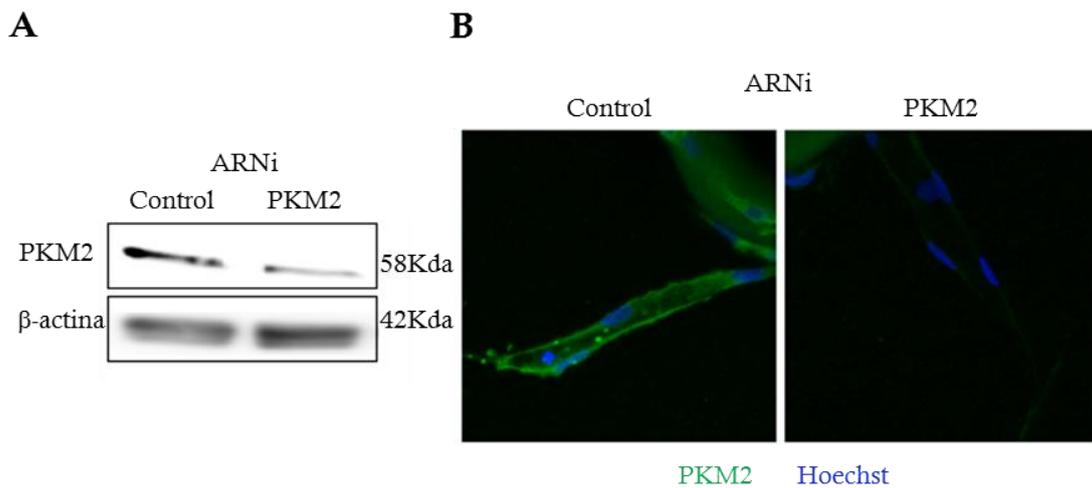


Figura 28. La interferencia de PKM2 se conserva al final del ensayo en las microesferas. A) Western Blot representativo de lisados de proteínas de HUVECs interferidas para PKM2 que no se usaron para generar las microesferas. Las proteínas analizadas fueron PKM2, y β actina como control de carga. **B)** Imagen representativa de una proyección máxima de imágenes confocales de una estructura saliente de microesferas recubiertas de HUVECs interferidas para un ARNi control (izquierda) o PKM2 (derecha). La expresión de PKM2 se observa en verde, mientras que los núcleos, en azul (Hoechst).

2.4.3. Análisis de la proliferación celular en el modelo esferoides recubiertos de HUVECs

Estudiamos mediante el marcador de proliferación Ki67 el porcentaje de células que estaban dividiéndose. No se encontraron diferencias en proliferación entre las estructuras tipo capilares formadas por células interferidas para PKM2, y las células interferidas control (Figura 29).

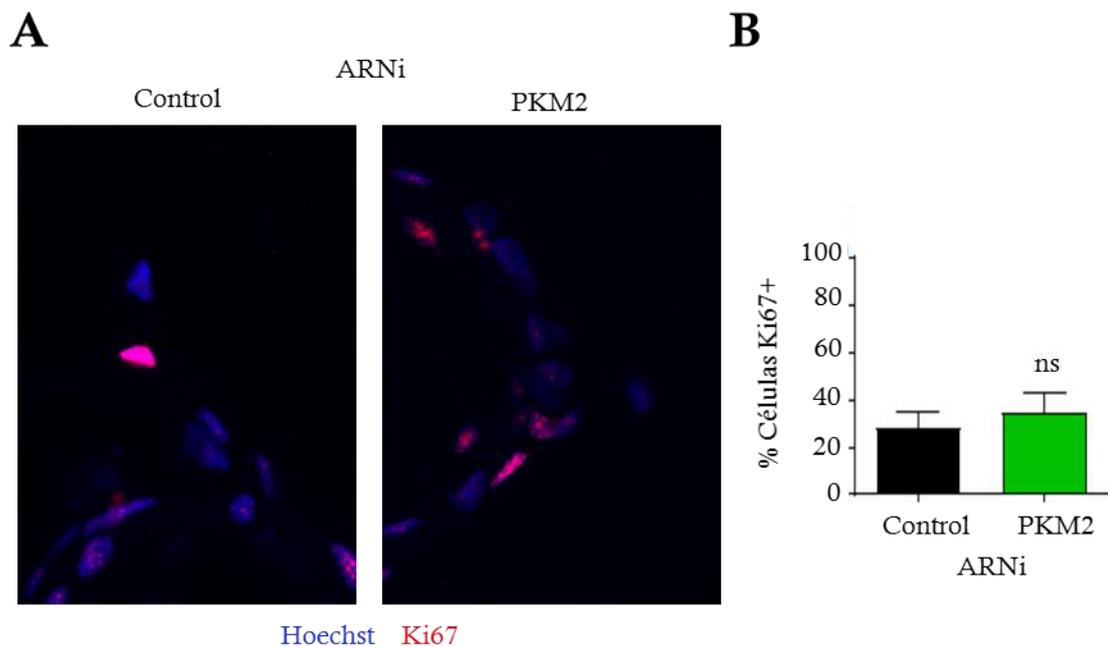


Figura 29. La expresión de PKM2 no varía el porcentaje de células proliferando en las células de las estructuras tubulares de las microesferas. A) Imagen representativa de una proyección máxima de imágenes confocales de una estructura saliente de microesferas recubiertas de HUVECs interferidas para un ARNi control (izquierda) o PKM2 (derecha). Las células positivas para Ki67 (rojo) se observan en contraste con los núcleos (azul). **B)** Cuantificación del porcentaje de células positivas para Ki67 en las estructuras tubulares. Se analizó mediante el test estadístico de la t de student de dos vías. ns: no significativo. n=3.

2.4.4. Análisis de la formación de filopodias en las estructuras tubulares de esferoides recubiertos de HUVECs embebidos en geles de fibrina.

Uno de los fenómenos que permite a las células migrar en la formación de los nuevos vasos es la capacidad de generar protusiones de citoesqueleto y membrana denominadas filopodias.

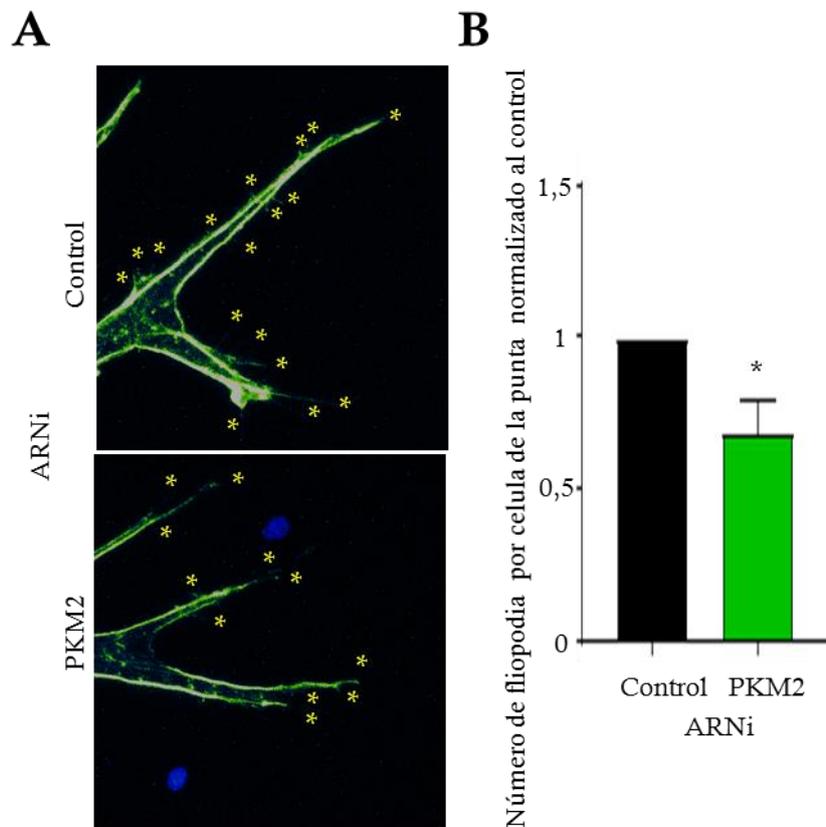


Figura 30. La interferencia de PKM2 regula que haya menos filopodia en las células de la punta de las microesferas. **A)** Imagen representativa de una proyección máxima de imágenes confocales de una estructura saliente de microesferas recubiertas de HUVECs interferidas para un ARNi control (izquierda) o PKM2 (derecha). F-actina se observa en pseudocolor, mientras que los núcleos, en azul (Hoechst). **B)** Cuantificación del porcentaje de filopodias por células de la punta en las estructuras tubulares normalizado frente a las formadas en las células interferidas control. Se analizó mediante el test estadístico de la t de student pareado. * $p < 0,05$. $n = 5$.

Cuantificamos el número de filopodia por célula de la punta por inmunofluorescencia, gracias a la tinción con faloidina (Figura 30A), que nos permite visualizar el citoesqueleto de actina. Como se puede observar en el gráfico, el número de filopodias era significativamente menor en las estructuras formadas por células endoteliales interferidas para PKM2 (Figura 30B).

2.4.5. Análisis de la formación de lumen en las estructuras tipo capilares.

Analizamos si se producía algún defecto en la formación del lumen como consecuencia de la interferencia de PKM2 en HUVECs. La correcta generación del mismo es necesario para que en los nuevos vasos circulen los fluidos. Como se observa en la (Figura 31A), tanto en las estructuras control, como en las interferidas para PKM2, se puede apreciar el lumen como un espacio entre las células.

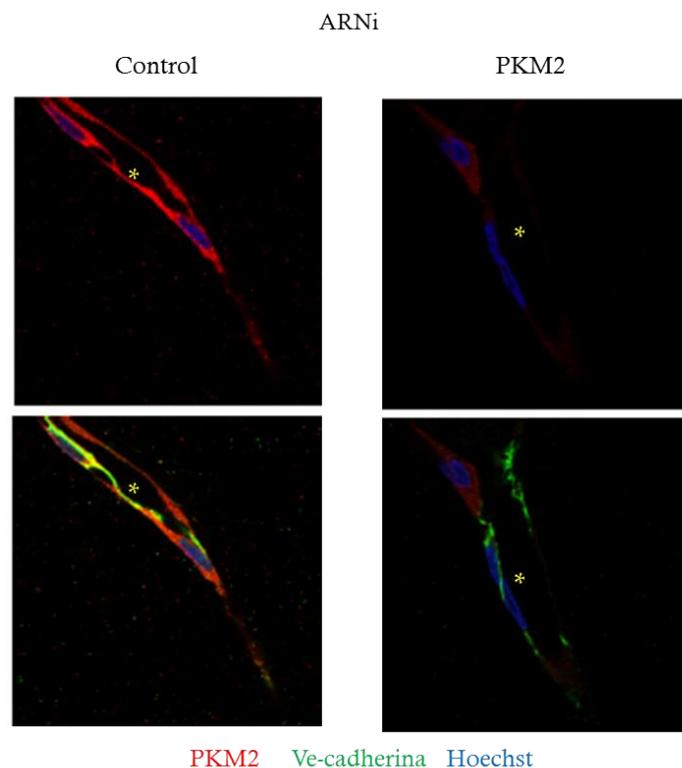


Figura 31. Las estructuras de las microsferas de células interferidas para PKM2 forman un lumen bien estructurado. Imagen representativa de una sección confocal de una estructura creciente de células endoteliales interferidas con un ARNi control (izquierda) o PKM2 (derecha). Ve-cadherina se observa en verde, PKM2 en rojo, mientras que los núcleos, en azul (Hoechst).

2.4.6. Análisis de la complejidad de las uniones endoteliales mediante el algoritmo de patrones de morfología de Ve-cadherina.

Para estudiar la morfología de las uniones celulares en este ensayo, en un primer lugar realizamos inmunofluorescencias para detectar Ve-cadherina en las estructuras tipo capilares (Figura 32A). Después de tomar imágenes confocales de fluorescencia, procedimos a analizarlas con el algoritmo para la clasificación de los patrones de la morfología de uniones celulares. Este algoritmo, en primer lugar nos dividió la imagen en pequeñas porciones, para después mostrarnos esas diferentes imágenes de forma aleatoria. Calificamos la morfología de las uniones entre discontinuas e irregulares y más continuas y regulares. Después, el programa realiza una reconstrucción en la que las porciones de imagen han sido sustituidas por el color correspondiente a la calificación de morfología que le ha sido otorgada (Figura 32B).

En las estructuras formadas a partir de las células interferidas control podemos observar cómo las regiones discontinuas y continuas se van alternando formando un mosaico de los diferentes colores. En cambio en las estructuras procedentes de células interferidas para PKM2, vemos cómo este mosaico es menos apreciable, produciéndose una acumulación de porciones con uniones más irregulares de forma consecutiva (Figura 32B).

Al representar la gráfica del porcentaje de las diferentes clasificaciones de morfologías, podemos observar cómo, de hecho, hay un desplazamiento de la curva hacia el lado izquierdo cuando las células han sido interferidas para PKM2 (Figura 32C). De hecho, al hallar el ratio entre regiones activas/inactivas encontramos que es mayor cuando PKM2 está interferida (Figura 32D).

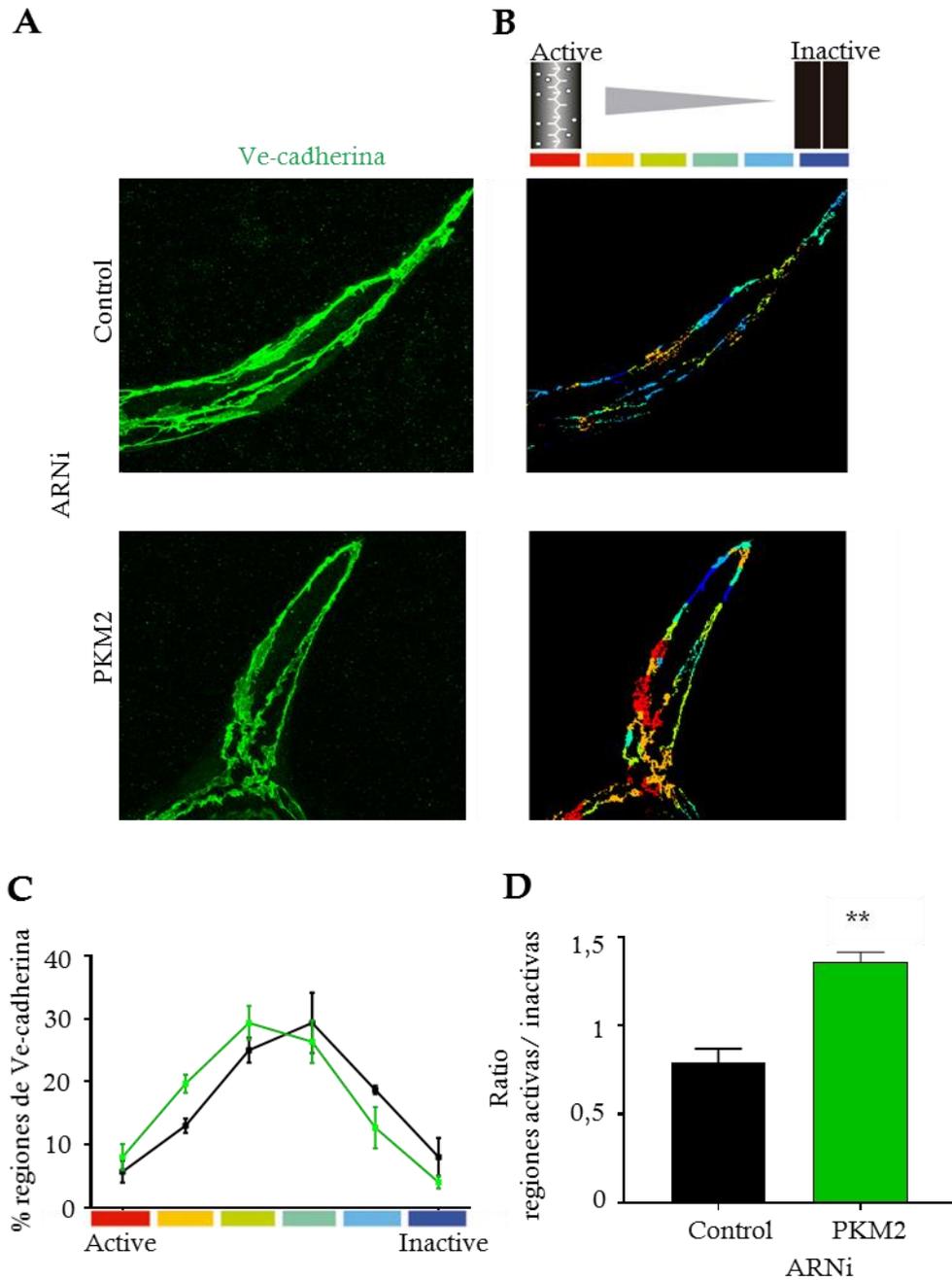


Figura 32. El patrón de clasificación de morfología de uniones endoteliales está desplazado hacia uniones activas en las estructuras tubulares de microesferas formadas por células interferidas para PKM2. **A** y **B**) Imágenes de microscopia confocal de máximas proyecciones de células de las estructuras similares a capilares, en las que se muestra la tinción de Ve-cadherina (verde) (izquierda), y la representación del mosaico de clasificación (derecha). **C**) Cuantificación de la clasificación del tipo de patrón de Ve-cadherina. **D**) Cuantificación del porcentaje de uniones activas/inactivas. Se analizó estadísticamente con el test de t de student de dos colas. n=3. ** p<0,01.

En definitiva, hemos descrito cómo en procesos angiogénicos, PKM2 afecta tanto a la producción de filopodias por parte de células de la punta, como a la regulación de las dinámicas de Ve-cadherina en las uniones endoteliales. La proliferación, al igual que en las células en cultivo, no resultó afectada.

3. Localización de PKM2 en células endoteliales.

Ya que PKM2 parece regular ciertas funciones específicas en determinadas regiones celulares, como los filopodias o las uniones endoteliales, decidimos analizar dónde se localiza PKM2 para poder realizar estas funciones.

3.1. Monocapas confluentes de células endoteliales.

En primer lugar, analizamos en qué regiones de las células endoteliales se localizaba en monocapas confluentes de HUVECs. En este momento el estado en el que se encuentran las células es similar a cuando se encuentran en homeostasis en los vasos sanguíneos.

Realizamos inmunofluorescencias en las que utilizamos un anticuerpo específico contra la isoforma M2 de la piruvato quinasa, combinando en la tinción con un anticuerpo contra la proteína de uniones adherentes Ve-cadherina.

Al analizar la localización de PKM2, podemos observar una distribución perinuclear en el citoplasma (Figura 33A). Sin embargo, al analizar en mayor resolución, nos percatamos de que hay una porción de PKM2 que se encuentra en regiones cerca de la membrana y las uniones celulares, en los que hay un solapamiento con la tinción de Ve-cadherina (Figura 33B). Confirmamos que se localizaban en los mismos lugares mediante una vista del perfil de intensidades de píxeles (Figura 33C).

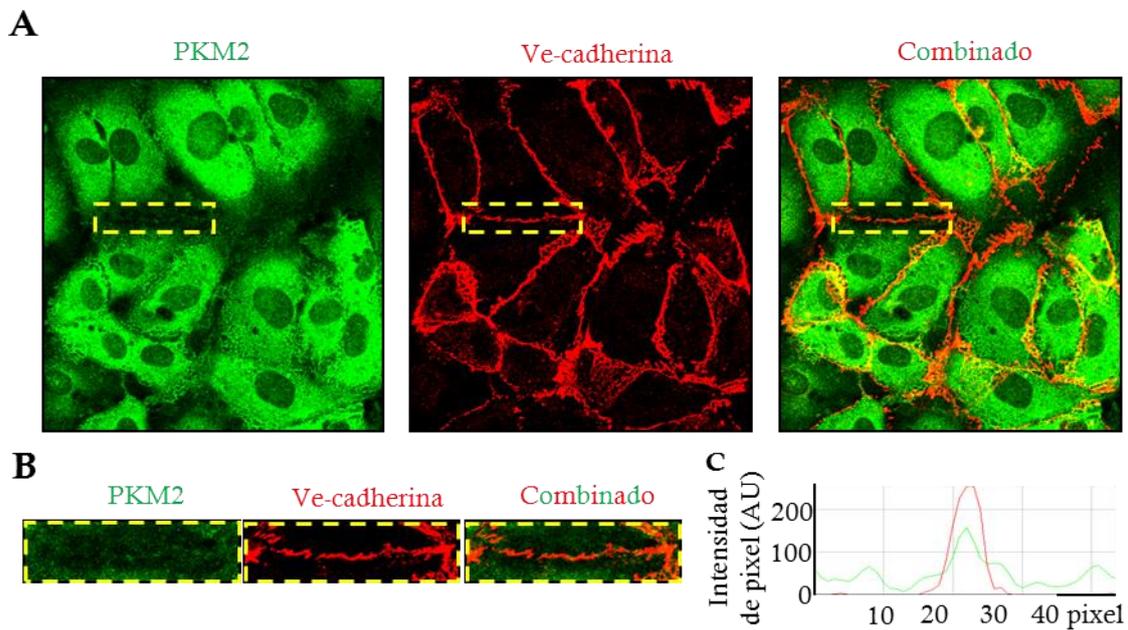


Figura 33. Una porción de PKM2 se localiza en las uniones endoteliales células endoteliales en confluencia. A) Imagen de una proyección máxima de imágenes confocales de HUVECs en estado confluyente. PKM2 (verde), Ve-cadherina (rojo). Las zonas en las que hay solapamiento se vislumbran de color amarillo. B) Región aumentada de la imagen A, en la que se observa el solapamiento entre las señales de PKM2 y Ve-cadherina en la unión. C) Perfil de intensidad de pixeles de PKM2 (verde) y Ve-cadherina (rojo) en la unión endotelial.

Además, al analizar la localización de PKM2 en referencia a la distribución de la actina que se encuentra asociada a las uniones endoteliales, observamos que existía también un solapamiento (Figura 34A), confirmado en la vista del perfil de intensidad de pixeles (Figura 34C).

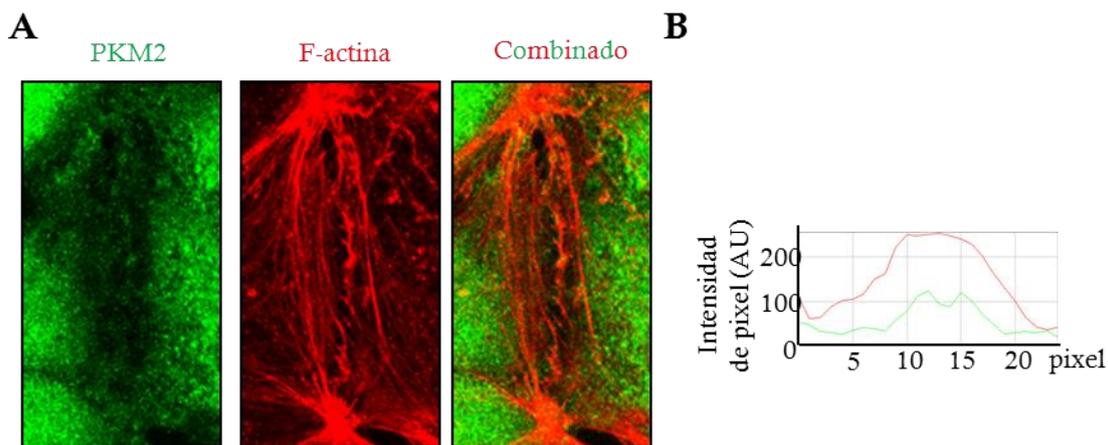


Figura 34. PKM2 se localiza junto a la F-actina que está asociada a uniones en células endoteliales en confluencia. A) Imagen de una proyección máxima de imágenes confocales de HUVECs en estado confluyente. PKM2 (verde), F-actina (rojo). Las zonas que hay solapamiento se vislumbran de color amarillo. **B)** Perfil de intensidad de pixeles de PKM2 (verde) y F-actina (rojo) en la unión endotelial.

3.2. Monocapas de células endoteliales que se encuentran remodelando sus uniones endoteliales.

Ya que en el punto anterior se analizó la localización en una situación de confluencia, quisimos estudiar si la proteína se localizaba también en esas regiones de uniones celulares en otras situaciones más activas, como las que ocurren tras un estímulo que remodelase las uniones celulares.

Para ello utilizamos en primer lugar un estímulo que provocase un reforzamiento de las uniones celulares. Cuando analizamos la localización de PKM2 en las células endoteliales tras el estímulo con S1P (1 μ M 15 min), encontramos que también se encuentra localizada en las uniones. PKM2 por lo tanto está presente en esas regiones celulares, tanto en condiciones estables, como en situaciones en las que se remodelan las uniones (**Figura 35A y B**). Además, en esta situación también se localizan junto a la F-actina que se asocia a las uniones endoteliales (**Figura 35C**).

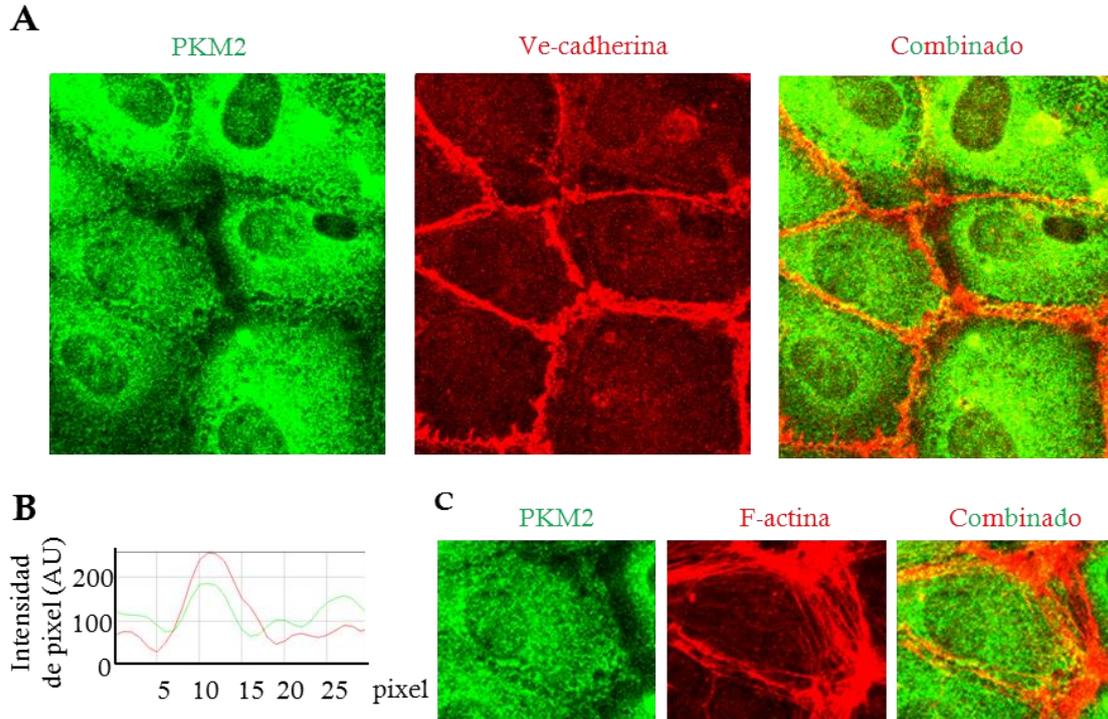


Figura 35. PKM2 se localiza en las uniones endoteliales en células endoteliales que han sido estimuladas para que se remodelen las uniones endoteliales. A) Imagen de una proyección máxima de imágenes confocales de HUVECs tratadas con S1P 1 μ M durante 15 min. PKM2 (verde), Ve-cadherina (rojo). Las zonas que hay solapamiento se vislumbran de color amarillo. **B)** Se acompaña de una vista ortogonal de las secciones de la imagen confocal en las que se ve el eje xz. **C)** Imagen de una proyección máxima de imágenes confocales de HUVECs en estado confluyente. PKM2 (verde), F-actina (rojo). Las zonas que hay solapamiento se vislumbran de color amarillo.

Analizamos también la localización con la actina en zonas de gran actividad del citoesqueleto de actina, como los lamelipodias. Así, comprobamos la localización de PKM2 en células que se encuentran migrando, observando que PKM2 se localiza en las uniones celulares, en las regiones ricas en citoesqueleto de F-actina (Figura 36).

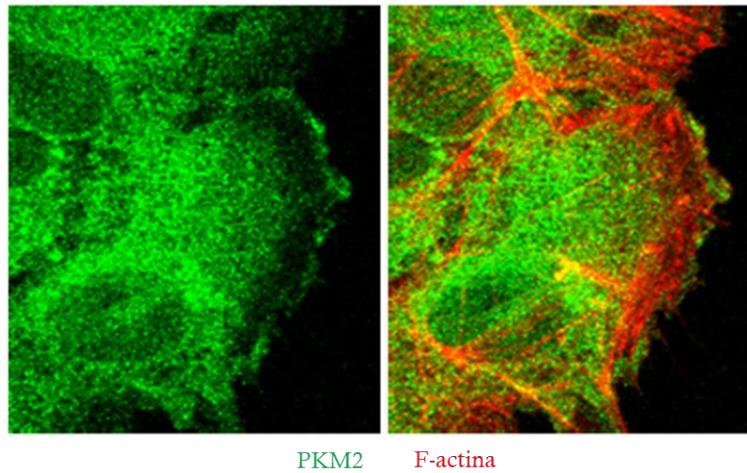


Figura 36. PKM2 se localiza en los lamelipodios en células endoteliales que migran. Imagen de una proyección máxima de imágenes confocales de HUVECs. PKM2 (verde), F-actina (rojo). Las zonas que hay solapamiento se vislumbran de color amarillo.

3.3. Análisis de las dinámicas de PKM2 en células endoteliales.

Quisimos analizar las dinámicas de PKM2 durante la remodelación de las uniones endoteliales. Para ello transfectamos en HUVECs un vector con una construcción de la proteína PKM2 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP). Mediante la realización de capturas en microscopia de célula viva en un microscopio confocal, se puede seguir el tránsito de PKM2-GFP. Tras el estímulo con SIP observamos cómo aumenta el tráfico alrededor de la unión entre las dos células endoteliales, y cómo múltiples vesículas de PKM2 se encuentran presentes en esa zona (Figura 37).

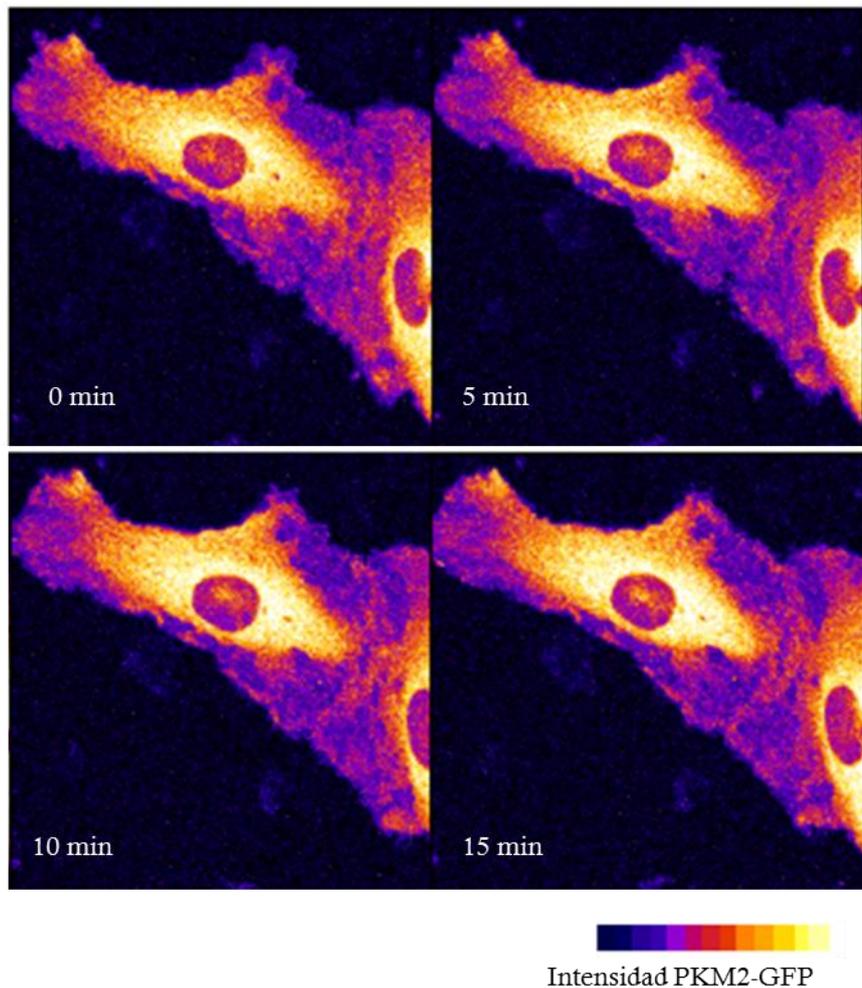


Figura 37. PKM2-GFP presenta una gran dinámica en regiones de uniones endoteliales que se remodelan. Máxima proyección de imágenes confocales que han sido transfectadas con PKM2-GFP, y tratadas con S1P $1\mu\text{M}$ durante 15 minutos. Se muestra en pseudocolor que va desde una intensidad baja en morado, pasando por magenta, hasta una intensidad alta en naranja.

Además, fijamos células transfectadas con PKM2-GFP, y comprobamos mediante inmunofluorescencia en células fijadas que la construcción fluorescente de PKM2 se encuentra colocalizando en las mismas regiones que las proteínas de uniones celulares endoteliales como Plakoglobina y alpha catenina (Figura 38).

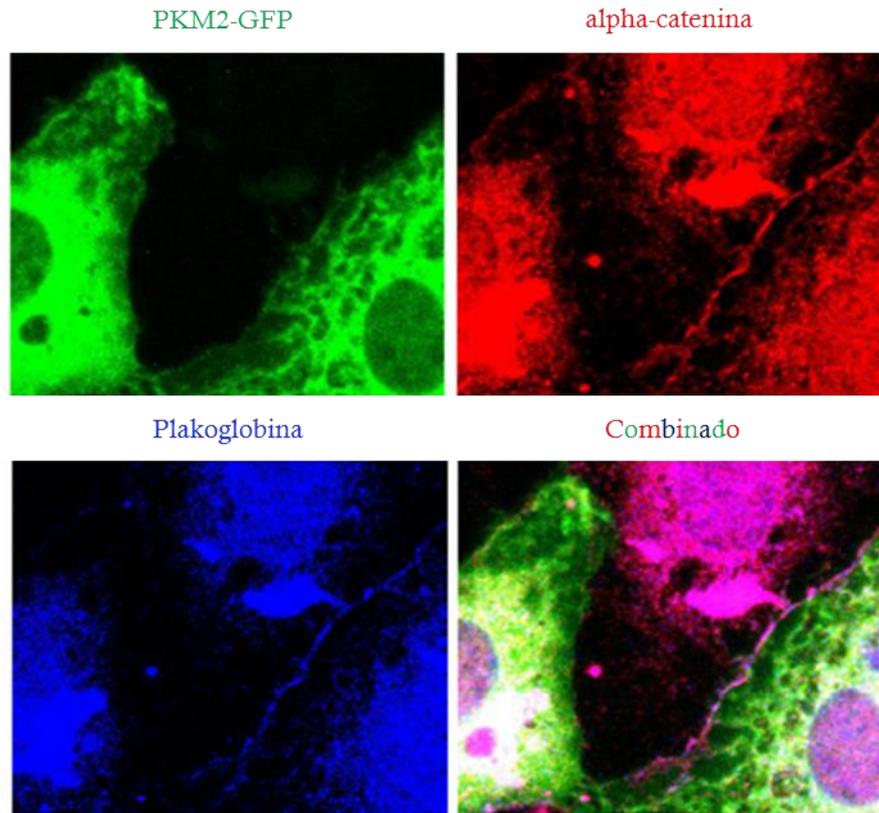


Figura 38. PKM2-GFP se localiza en las mismas regiones que otras proteínas de uniones endoteliales en HUVECs. Máxima proyección de imágenes confocales que han sido transfectadas con PKM2-GFP (verde), mostrando su colocalización con alpha catenina (rojo) y plakoglobina (azul).

3.4. Análisis de la localización de PKM2 en HUVECs mediante el subfraccionamiento celular de los diferentes compartimentos celulares.

Quisimos comprobar la presencia de esa porción de PKM2 en las uniones endoteliales mediante una aproximación bioquímica. Para ello quisimos analizar la distribución de expresión de PKM2 en el citosol y las membranas celulares. Después de homogenizar las células en una solución hipotónica y eliminar los núcleos y las mitocondrias, separamos por ultracentrifugación el citosol de los compartimentos membranales. Recogimos las dos fracciones y las analizamos mediante Western Blot.

Como marcador de citosol utilizamos la proteína Rho-GDI y como marcador membranal utilizamos la proteína de uniones celulares en endotelio, Ve-cadherina. Rho-GDI no se encuentra en la fracción membranal, mientras que la proteína de unión no se localiza en el citosol. En cuanto a la localización de PKM2, hallamos que se encuentra en la fracción de citosol, al igual que en la de las membranas totales de las células (Figura 39).

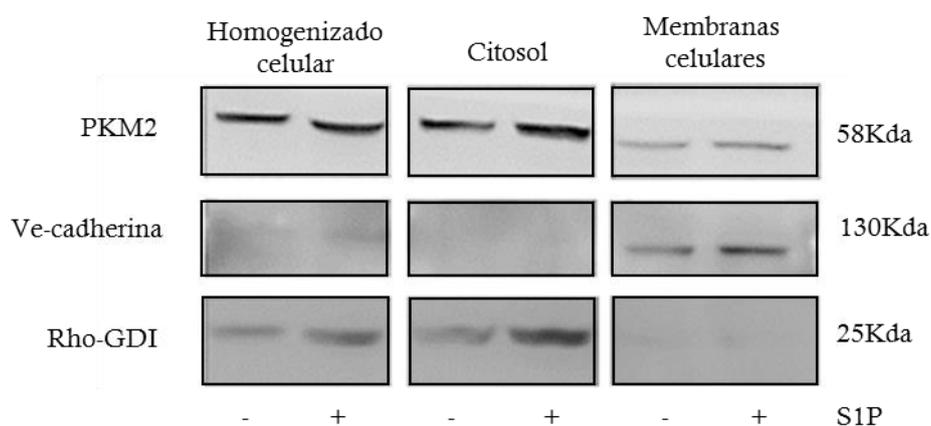


Figura 39. Expresión citosólica y membranal de PKM2. Western Blot representativo de la presencia de PKM2 en fracciones de citosol y en la correspondiente a las membranas totales. Rho-GDI usado como marcador de citosol, Ve-cadherina como marcador de membrana, y PKM2 como la proteína a estudiar. El tratamiento con S1P se marca con un signo + y los controles no tratados con un -.

Una vez que confirmamos la presencia de PKM2 en la fracción de membranas celulares, quisimos profundizar un poco más, y analizar en qué compartimentos membranales se localizaba PKM2, con el objetivo de estudiar su presencia en las regiones correspondientes a las uniones endoteliales. Tras eliminar el citosol, el núcleo y las mitocondrias, gracias a sus diferentes velocidades de sedimentación, tomamos las membranas totales, y realizamos una separación de los diferentes compartimentos membranales según su densidad, mediante la ultracentrifugación en un gradiente de concentración de optiprep, para después analizar mediante Western Blot las distintas fracciones recogidas.

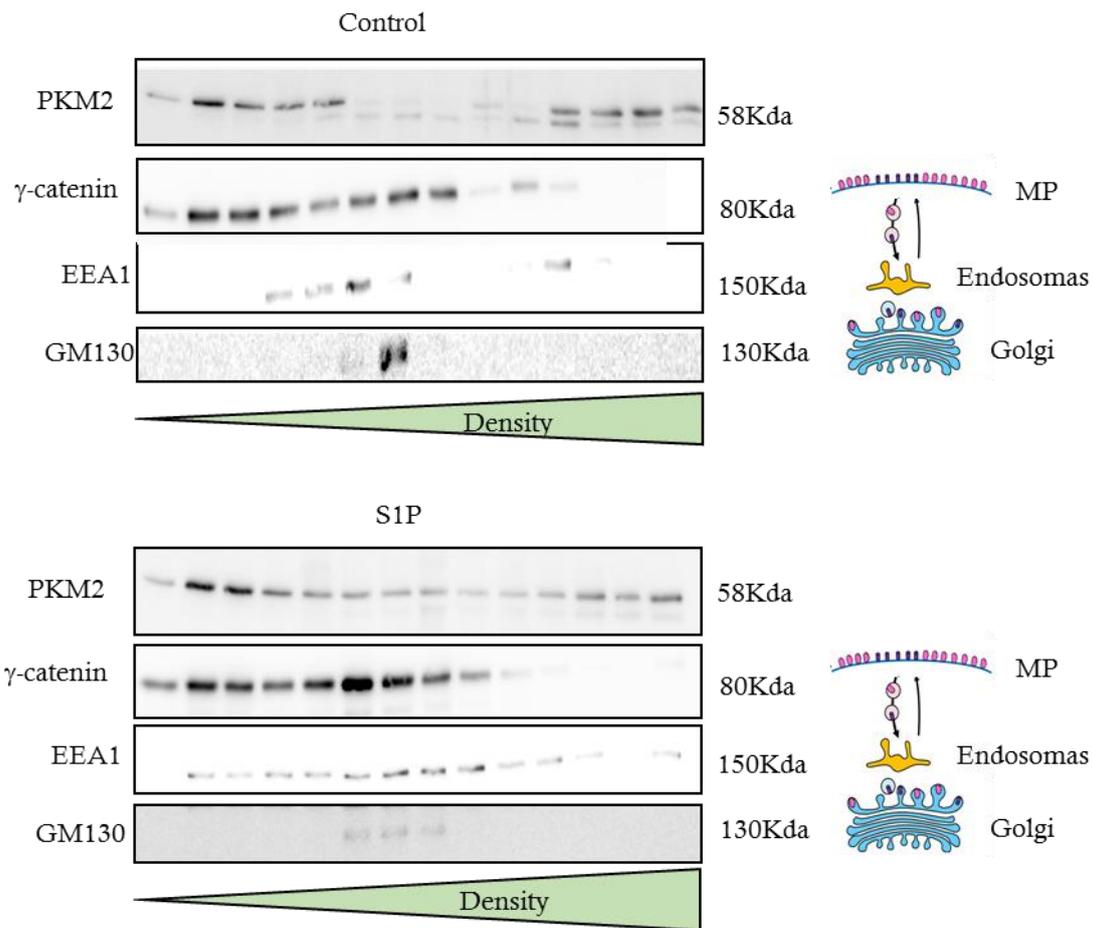


Figura 40. Expresión de PKM2 en la membrana plasmática en células endoteliales. Western Blot representativo de la presencia de PKM2 en fracciones de citosol y en la correspondiente a las membranas totales. MP (membrana plasmática), endosomas Golgi (Golgi), y PKM2 como la proteína a estudiar. Células no tratadas (Control) y células tratadas con S1P 1 μ M durante 15 minutos.

Como podemos comprobar en la (Figura 40), los diferentes compartimentos se hallan distribuidos según su densidad a lo largo de la membrana. Los compartimentos menos densos, situados a la izquierda, se encuentran enriquecidos en proteínas de uniones endoteliales, que se encuentran localizadas en la membrana plasmática. Como marcador de esta fracción utilizamos las proteínas de uniones celulares plakoglobina y Ve-cadherina.

Los demás compartimentos membranales celulares, como el retículo endoplasmático, el complejo de endosomas y el aparato de Golgi, se encuentran dispuestos en los siguientes carriles hacia las fracciones de mayor densidad del gradiente. Los marcadores usados para cada una de las fracciones fueron: el marcador de endosomas tempranos EEA1 para el compartimento del complejo de endosomas, y la proteína GM130, como marcador del Golgi.

PKM2 se localiza a lo largo de los carriles del gradiente, con una porción localizada en las fracciones correspondientes a la membrana plasmática, donde se encuentran las uniones celulares (Figura 40).

Analizamos además la localización de PKM2 en presencia de un estímulo remodelador de uniones endoteliales. Comprobamos como tras el tratamiento de las células endoteliales con esfingosina 1-fosfato, ocurre un desplazamiento de las fracciones en las que se localiza la proteína EEA1 de los endosomas, como consecuencia de un aumento del tráfico de proteínas en la membrana, característico de la respuesta celular a S1P. PKM2 también está presente en las fracciones de membrana plasmática en las células estimuladas con este tratamiento (Figura 40).

3.5. Localización de PKM2 en las células endoteliales en las estructuras tipo capilares.

Decidimos analizar si en las estructuras tipo capilares del ensayo de angiogénesis in vitro, PKM2 se localizaba también en las regiones que habíamos observado en células en cultivo en dos dimensiones.

Mediante inmunofluorescencia comprobamos que PKM2 se encontraba colocalizando con Ve-cadherina en las uniones de las células de la estructura tipo capilar (Figura 41A y B). Además pudimos comprobar que también se encuentran agregados de PKM2 en los filopodias de las células de la punta de las estructuras tipo capilares (Figura 41C).

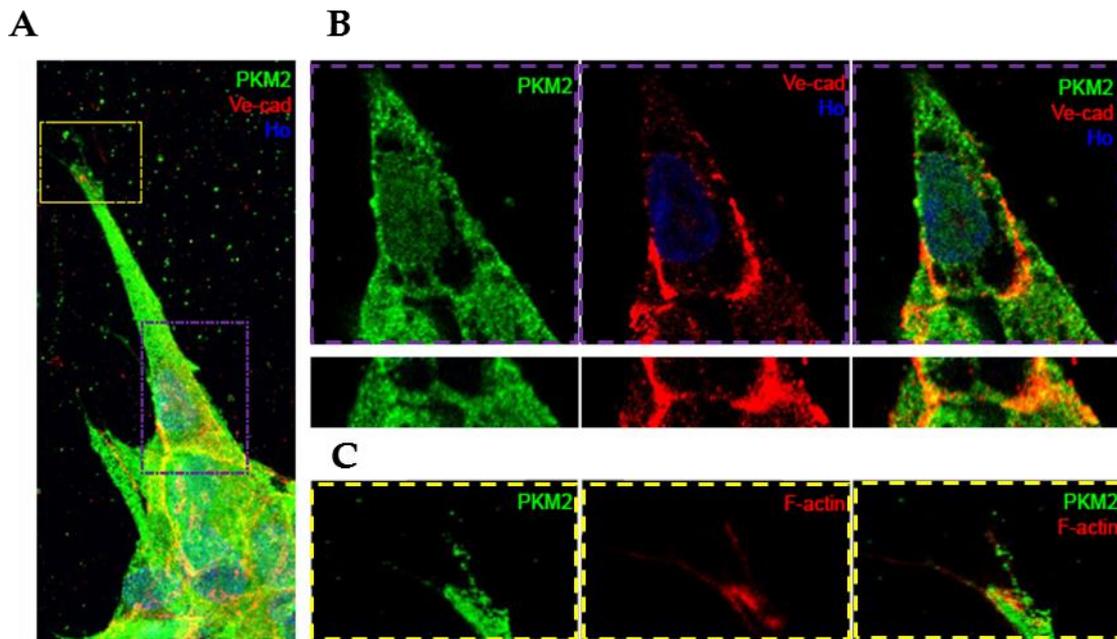


Figura 41. Localización de PKM2 en las uniones y en los filopodia de estructuras tubulares de los ensayos de angiogénesis in vitro. A) Imagen de una proyección máxima de imágenes confocales de una estructura tipo capilar. PKM2 (verde), Ve-cadherina (rojo), Hoechst (azul). B) Sección confocal de la célula de la punta en la que se analiza la unión endotelial. C) Análisis de la presencia de PKM2 en regiones ricas en F-actina como los filopodias (derecha).

4. Mecanismo de acción de PKM2 en la regulación de las funciones celulares endoteliales.

4.1. Función de PKM2 en el metabolismo endotelial.

Ya que PKM2 es una enzima de la glucólisis, quisimos estudiar a qué procesos metabólicos pudiera estar afectando. Realizamos el estudio de la acidificación del medio (ECAR), mediante el que se realiza una medición indirecta de la actividad de la glucólisis. Además, analizamos la actividad de la mitocondria mediante el ensayo del consumo de oxígeno, en el que obtenemos los valores en condiciones basales (OCRb) y en la máxima capacidad de actividad de la mitocondria (OCRm).

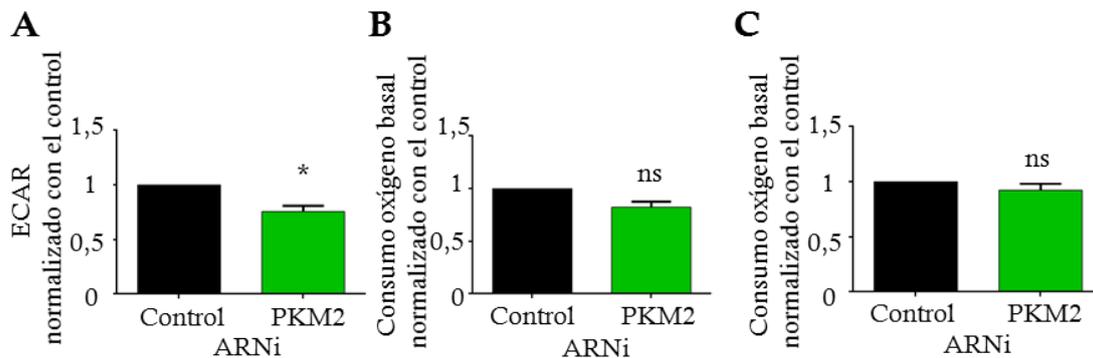


Figura 42. La interferencia de PKM2 reduce el metabolismo de la glucosa pero no afecta al metabolismo mitocondrial. A) Cuantificación de la acidificación del medio o ECAR. B) Cuantificación del consumo de oxígeno basal (OCRb). C) Cuantificación del consumo de oxígeno máxima (OCRm). Se realizó el test estadístico de t de student pareado. ns: no significativo. * $p < 0,05$. $n=3$.

Al analizar los valores de acidificación del medio, hallamos que se encontraban reducidos en las células endoteliales interferidas para PKM2 (Figura 42A). En cuanto a la actividad de la mitocondria, no hallamos que la interferencia tuviera efecto ni en condiciones basales, ni en condiciones de máxima capacidad (Figura 42B y C).

Por lo tanto, la reducción de la expresión de PKM2 afecta al ratio de actividad de la glucolisis, mientras que la actividad de la mitocondria permanece intacta.

4.2. Actividad de la piruvato quinasa en células endoteliales interferidas para PKM2.

El siguiente paso a la hora de analizar el metabolismo afectado por PKM2 es comprobar si la actividad de la enzima está afectada o existe algún tipo de compensación por parte de la porción de proteína que aún se expresa, ya que PKM2

podría regular su actividad para adaptarse a las circunstancias y requerimientos celulares.

En primer lugar, quisimos comparar la actividad de la piruvato quinasa en fracciones celulares que distinguieran la PKM2 que se encuentra en el citosol, de la porción que se encuentra asociada a regiones de membrana y citoesqueleto. Existen métodos de permeabilización que permiten retirar el contenido del citosol y así separar esta porción del resto de la célula, es decir, de las estructuras membranales y el citoesqueleto. En un estudio sobre GAPDH en las vesículas asociadas a microtúbulos en axones de neuronas, se utilizaba esta permeabilización para observar mejor esas vesículas (Zala et al, 2013). En otro estudio analizaban la actividad de otra enzima de la glucólisis, la aldolasa, asociada o no a citoesqueleto, para lo que realizaban una permeabilización extrayendo el citosol (Hu et al, 2016).

En nuestro caso decidimos utilizar una permeabilización suave con saponina en PBS a una concentración de 0,01%, para así extraer el citosol. Comprobamos por Western Blot el resultado de la permeabilización. Para extraer el resto de los compartimentos celulares tras retirar el citosol, permeabilizamos con una concentración de saponina en PBS del 0,1 %. Al comprobar la distribución de proteínas como Ve-cadherina y F-actina, observamos que solamente se encuentra en la fracción citoesquelética/membranal, mientras que en la fracción citosólica están ausentes (Figura 43A).

Analizamos además la localización de PKM2 en la fracción citoesquelética/membranal por inmunofluorescencia. Las células tratadas con saponina sólo conservan la cobertura celular, mientras que han liberado todo el contenido del citosol, como se puede observar en la tinción de Ve-cadherina (Figura 43B). En cuanto a PKM2, podemos observar cómo hay acúmulos en zonas en las que el citoesqueleto se encuentra cerca de la unión entre las células (Figura 43C).

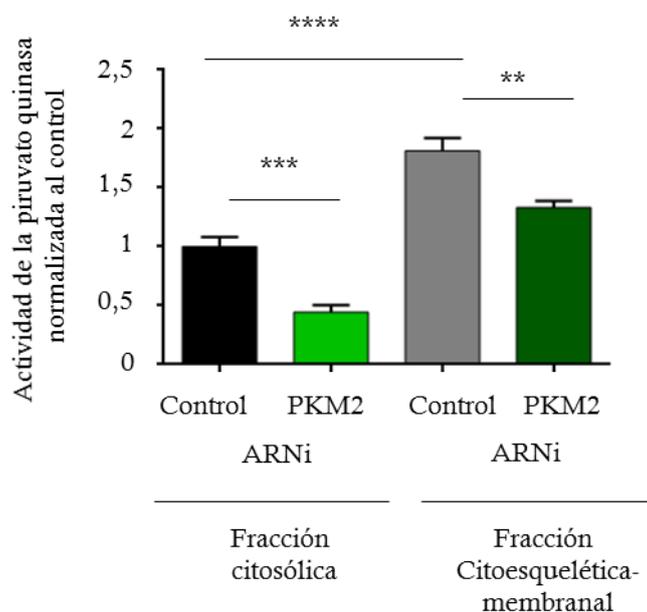


Figura 44. La actividad de la piruvato quinasa es mayor en la fracción citoesquelética-membranal, y en células endoteliales interferidas para PKM2 se encuentra reducida en ambas fracciones. **A)** Comparación de la actividad en HUVECs control en ambas fracciones. **B)** Efecto de la interferencia de PKM2 en la fracción citosólica (izquierda), y en la citoesquelética/membranal (derecha), en la actividad de la piruvato quinasa. Los datos están normalizados a la concentración de proteína de cada muestra. Se realizó el análisis mediante la t de student de dos colas.; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. $n = 4$.

4.3. Niveles de ATP en células endoteliales interferidas para PKM2.

Una vez que hemos determinado que la interferencia de PKM2 disminuye la actividad de piruvato quinasa, quisimos comprobar si eso producía algún efecto en los niveles de ATP, ya que, si hubiera menores cantidades de ATP en las uniones endoteliales y en las regiones membranales, podrían ser las responsables de los

defectos que hemos observado en células endoteliales interferidas para PKM2. Para medir esta molécula utilizamos el método de la luciferina/luciferasa. La luciferasa procesa luciferina en presencia de ATP produciendo en ese proceso luz, por lo que a mayor cantidad de ATP se produce más luz, que podemos cuantificar por luminiscencia en un luminómetro.

Al analizar el ATP en células endoteliales interferidas para PKM2, hallamos que la cantidad de esta molécula era menor, en comparación con las células control (Figura 45A).

Quisimos profundizar en este estudio, y determinar si esta diferencia se confirmaba en las fracciones anteriormente estudiadas para hallar la actividad de la piruvato quinasa. En ambas fracciones encontramos una disminución de la cantidad de ATP (Figura 45B y C).

Decidimos realizar un estudio más exhaustivo en el análisis de ATP, cuantificándolo en compartimentos subcelulares. Para ello utilizamos una sonda fluorescente que permite medir el ATP, y que analizando a gran magnificación en imágenes confocales, nos permite cuantificarlo en las diferentes regiones celulares. GO-aTeam1 es una construcción formada por dos proteínas fluorescentes, GFP (proteína fluorescente verde) y OFP (proteína fluorescente naranja). Funciona como un sistema FRET, en el que la emisión producida por GFP excita OFP, produciendo una emisión de este fluoróforo.

Esta construcción tiene la peculiaridad de que al unírsele ATP, los dos fluoróforos se acercan, por lo que a mayor cantidad de ATP, se encontrarán a menor distancia, y por tanto la transferencia de fluorescencia desde GFP a OFP será mayor, permitiendo cuantificarlo. La fluorescencia de GFP se utiliza para normalizar entre células con diferente expresión del sensor. Por ello los resultados se presentan en el ratio OFP/GFP (Figura 45D).

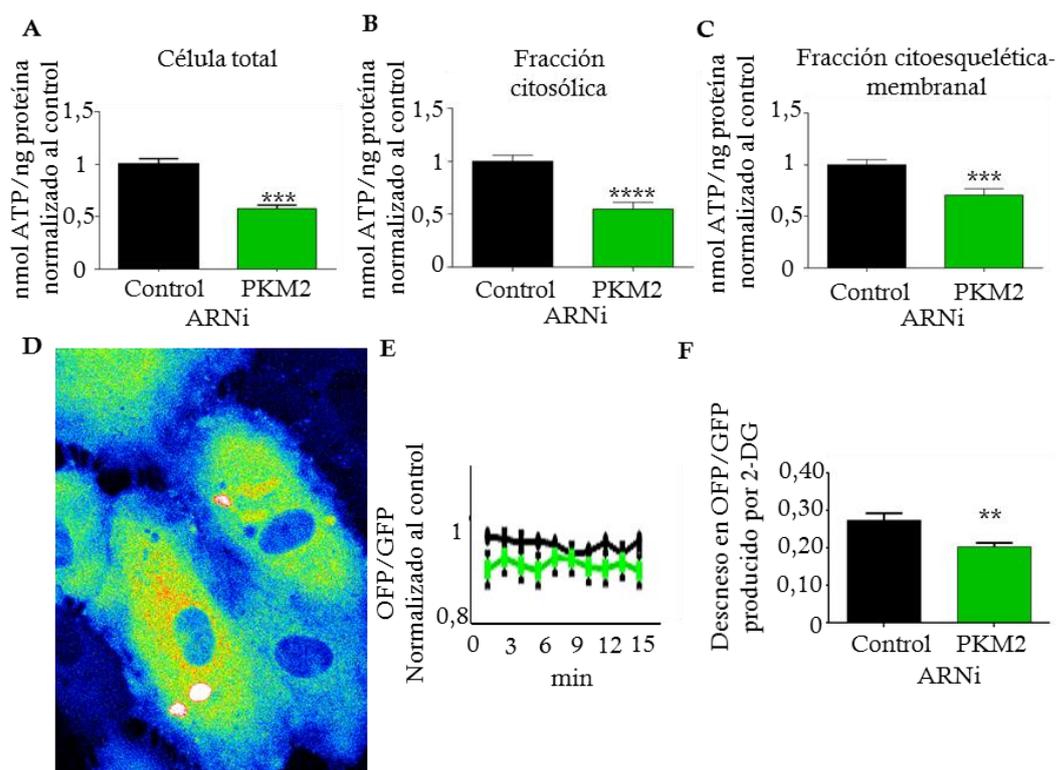


Figura 45. Los niveles de ATP en células endoteliales interferidas para PKM2 están reducidos. A) Cuantificación en extractos totales de HUVECs. **B y C)** Cuantificación en las fracciones permeabilizadas con saponina. Se realizó el análisis estadístico con la t de student y con el método de ANOVA para más de dos muestras, con el postest de Sidak. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. $n = 8$. **D)** Imágenes de máximas proyecciones de microscopía confocal de la construcción OFP/GFP en células confluentes **E)** Gráfica de evolución del ratio OFP/GFP en células confluentes tratadas. Se analizaron unas 20 células por experimento, en tres experimentos independientes. **F)** Descenso del ratio OFP/GFP en células tratadas con 2-Deoxiglucosa (2mM). Se analizaron unas 20 células por experimento, en tres experimentos independientes. Se realizó el análisis estadístico con la t de student de dos colas. * $p < 0,01$. $n = 3$.

Analizando el efecto de la interferencia de PKM2 en células confluentes, hallamos que el ratio OFP/GFP era ligeramente menor en las regiones membranales en las células interferidas (Figura 45E).

Comparamos la reducción basal con lo que ocurre con la inhibición general de la glucólisis, mediante la administración de 2-Deoxyglucosa, para saber en qué rangos

de reducción afectaba la interferencia de PKM2. Como se observa en el gráfico, la inhibición con 2-DG reduce el ratio OFP/GFP en menor proporción en células interferidas para PKM2 (Figura 45F), por lo que esa diferencia se debe a la interferencia de PKM2, la cual es similar a los valores obtenidos en la figura 45E. Combinando esos resultados con los obtenidos en la prueba de la actividad de la piruvato quinasa, y en los niveles de ATP en las fracciones citoesquelética-membranales, podemos afirmar que hay una reducción de ATP en las regiones donde se encuentran las uniones endoteliales.

4.4. Análisis del efecto de la inhibición de la actividad de PKM2 en los parámetros celulares endoteliales.

Ya que las células interferidas para PKM2 poseen menor actividad de piruvato quinasa y menor producción de ATP, decidimos estudiar la disminución de la actividad de PKM2 en células endoteliales. Para poder estudiarlo, utilizamos el inhibidor de su actividad Shikonina. Usamos una concentración de 2 μ M, ya que a esos niveles es específico de la actividad de PKM2, y además no disminuye la viabilidad de las células (Chen et al, 2011). Las células controles fueron tratadas con el vehículo en el que se disuelve Shikonina, DMSO.

4.4.1. Análisis del efecto de la inhibición de la actividad de PKM2 en células en cultivo.

4.4.1.1. Estudio de la proliferación y la migración.

Realizamos el ensayo de proliferación cultivando las células a lo largo de los días con Shikonina, para testar si reduciendo la actividad catalítica de PKM2 se produce algún efecto en la proliferación. El tratamiento no alteró el número de células a lo largo de los días en comparación con las células tratadas con DMSO (Figura 46A).

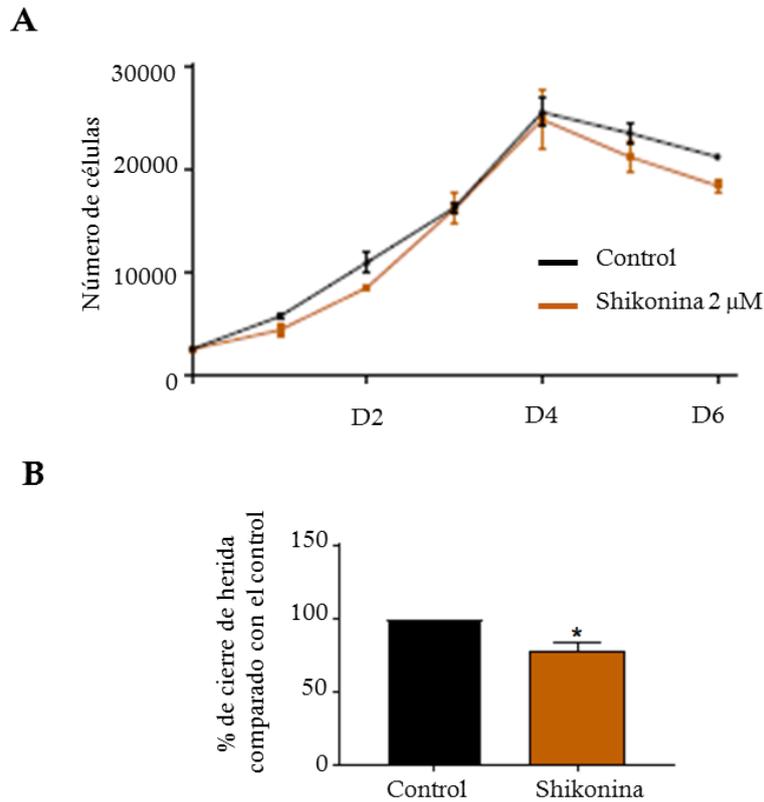


Figura 46. Los efectos de la interferencia de PKM2 en proliferación y migración, se reproducen con el tratamiento con shikonina. A) Gráfica de crecimiento a lo largo de los días. Línea negra es control tratado con DMSO, mientras que línea naranja es shikonina 2 μ M. **B)** Resultado de la cuantificación del porcentaje de área de la herida que ha desaparecido debido a la migración de las células endoteliales, normalizado frente a las células control tratadas con DMSO. Se utilizó el análisis de t de student pareado. * $p < 0,05$. $n=3$.

Realizamos el ensayo de cierre herida inhibiendo la capacidad catalítica de PKM2, mediante el tratamiento durante todo el experimento con Shikonina. Las células tratadas migraron menos (**Figura 46B**).

4.4.1.2. Análisis de la función de la actividad de PKM2 en la regulación de las dinámicas de las uniones endoteliales.

Analizamos si el cambio de morfología de Ve-cadherina se debía a la actividad que estuviera realizando PKM2 en esa región. Para ello tratamos monocapas

confluentes de HUVECs con shikonina durante una hora, y después analizamos la morfología de las uniones, tanto en condiciones basales como en células tratadas con S1P.

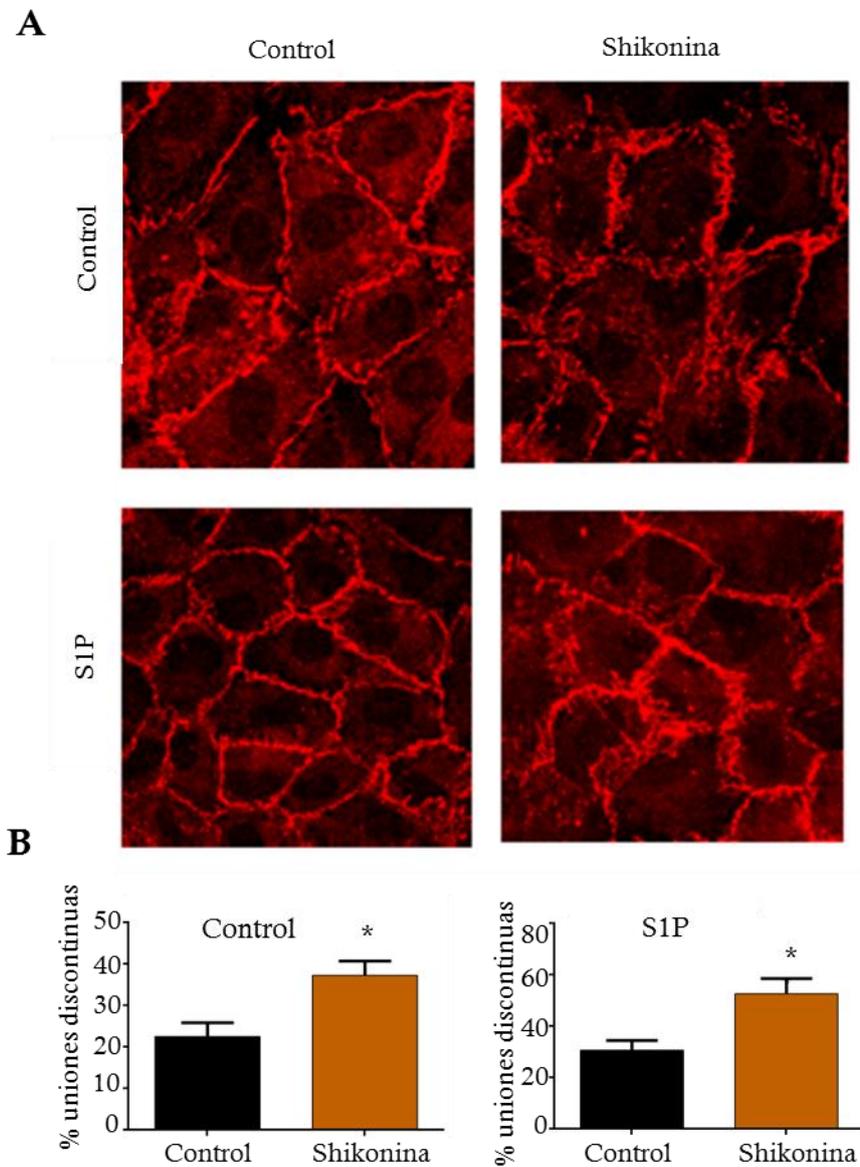


Figura 47. La inhibición de actividad de PKM2 provoca defectos en las uniones endoteliales. A) Imágenes de microscopía confocal de máximas proyecciones en las que se muestra la tinción de Vcaderherina (verde), PKM2 (rojo), en células control, y en células tratadas con S1P (1 μ M 15 min). **B)** Cuantificación del porcentaje de uniones discontinuas en ambas condiciones. Se normalizó frente al control tratado con DMSO en ambos casos. Se analizó estadísticamente con el test de t de student pareado. * $p < 0,05$. $n = 4$.

En ambos casos, a pesar de que no se observa un descenso en la intensidad de Vcaderherina, hallamos que el porcentaje de uniones endoteliales discontinuas se encontraba aumentado tras el pretratamiento con shikonina, en ambas condiciones, tanto basales, como tras el tratamiento con esfingosina 1-fosfato (Figura 47).

4.4.2. Estudio de la inhibición de la actividad de PKM2 en los ensayos de angiogénesis in vitro.

Quisimos comprobar si los efectos que afectan a la formación de vasos se debían a la actividad catalítica de PKM2. Para testarlo, realizamos el mismo ensayo de formación de estructuras, añadiendo al medio de cultivo shikonina (2 μ M) (Figura 48A).

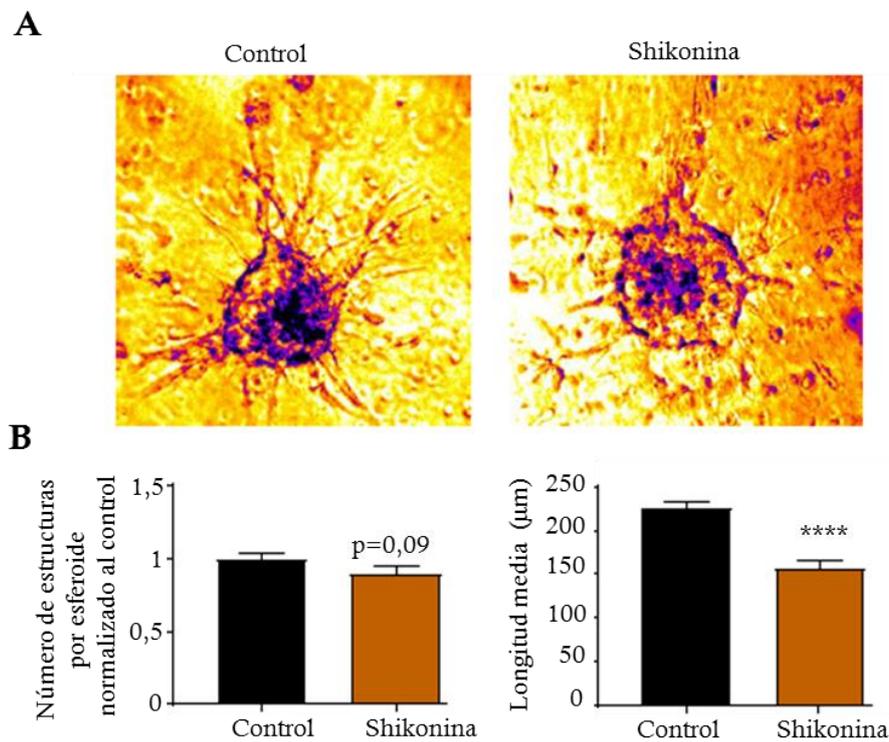


Figura 48. La inhibición de PKM2 reduce la formación de estructuras tipo capilares en esferoides de células tratadas con Shikonina. A) Imágenes de microscopía de campo claro, en las que se observan las estructuras tubulares saliendo del esferoide. **B)** Cuantificación del número de estructuras por esferoide (izquierda), y de su longitud media (derecha), ésta, normalizada frente a la longitud media en el esferoide control. Se realizaron análisis estadísticos mediante el test de la t de student de dos colas. ***p>0,001. n= 3

Al realizar el ensayo, pudimos determinar que la longitud y el número de estructuras tipo capilares estaban reducidos con el tratamiento con shikonina, aunque en el caso del número de túbulos, las diferencias no fueron significativas ($p=0,09$) (Figura 48B). Realizamos el mismo experimento en el ensayo de esferoides recubiertos de células, tratando las células desde el primer día del ensayo con shikonina. La cuantificación de las estructuras por microscopía de campo claro reveló que la inhibición de la actividad de PKM2 reducía tanto el número, como la longitud de dichas estructuras (Figura 49).

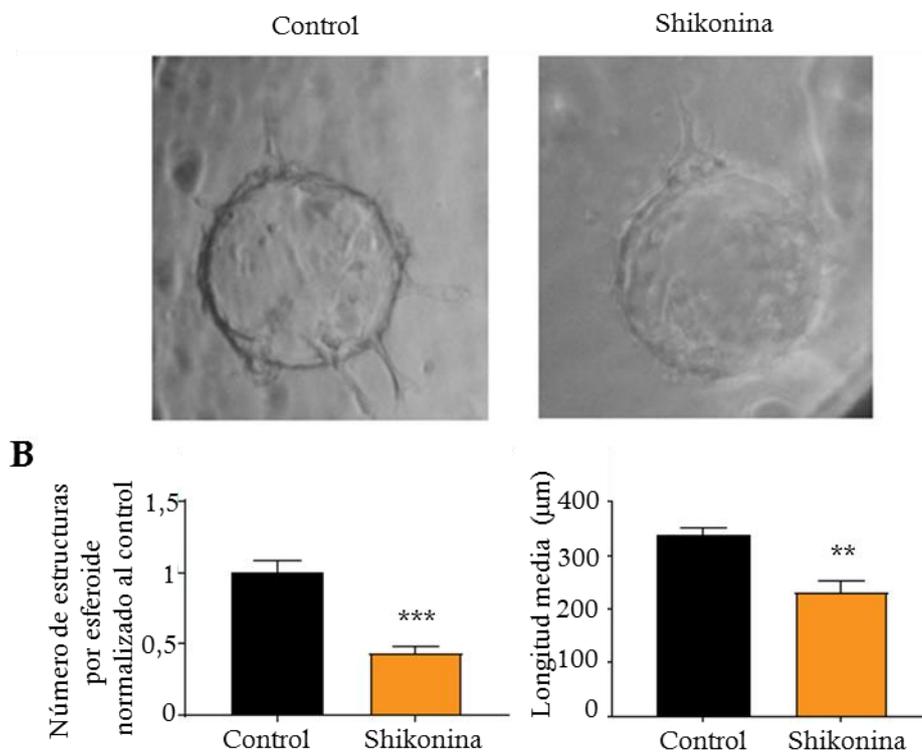


Figura 49. La inhibición de PKM2 reduce la formación de estructuras tipo capilares en esferoides recubiertos de células tratadas con Shikonina, embebidas en geles de fibrina. **A)** Imágenes de microscopía de campo claro, en las que se observan las estructuras tubulares saliendo del esferoide. **B)** Cuantificación del número de estructuras por esferoide (izquierda), y de su longitud media (derecha), normalizado en el caso del número frente la media en el esferoide control. Se realizaron análisis estadísticos mediante el test de la t de student de dos colas. ** $p > 0,01$. *** $p < 0,001$. $n = 3$.

4.5. Análisis de los parámetros celulares endoteliales con un inhibidor global de la glucolisis.

Estudiamos si las funciones controladas por PKM2 resultaban exclusivas de su regulación. Por ello decidimos inhibir la glucolisis desde sus primeras etapas, mediante el tratamiento con 2-DG (2-deoxiglucosa), un competidor de la glucosa en la unión con la Hexoquinasa, que ha sido demostrado que inhibe la formación de estructuras tubulares in vitro.

4.5.1. Estudio de la proliferación de células tratadas con el inhibidor de la glucolisis 2-DG.

Ya que la inhibición de la actividad de PKM2 no tiene efectos en proliferación, quisimos analizar qué ocurriría en el caso de una inhibición general de la glucolisis. Para ello tratamos con 2-DG a una concentración de 2mM durante 24 horas, en las que analizamos el porcentaje de células positivas para el marcador Ki67. Durante el ensayo analizamos paralelamente células interferidas para PKM2 para comprobar la diferencia entre ambos tipos de células. Al cuantificar, observamos que el porcentaje de células positivas era menor únicamente con el tratamiento con 2-DG (Figura 50).

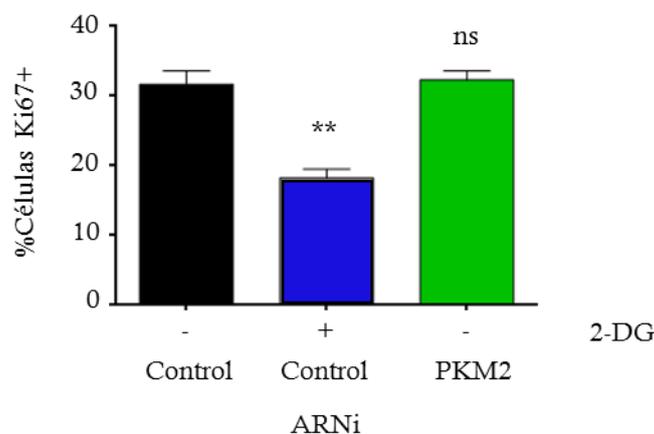


Figura 50. La inhibición de la glucolisis con 2-DG reduce la proliferación de las células endoteliales. Cuantificación del porcentaje de células positivas para Ki67 comparado con las células interferidas controles. Se realiza el test estadístico ANOVA con el postest Sidak para comparar parejas de muestras. ns: no significativo, ** $p < 0,01$. $n=3$.

4.5.2. Estudio de la migración en células tratadas con el inhibidor de la glucólisis 2-DG.

Realizamos el ensayo de cierre de herida tratando las células con 2-DG a una concentración de 2mM durante todo el ensayo. Tomamos fotos de microscopia de campo claro a tiempo inicial y al cabo de 16 horas. Al igual que cuando estudiamos la proliferación, paralelamente analizamos células interferidas para PKM2 para comprobar la diferencia entre ambos tipos de células.

Al cuantificar, observamos que las células habían migrado menos tanto en el caso de las células interferidas, como con el tratamiento con 2-DG. Entre los dos tratamientos no encontramos diferencias significativas ($p=0,57$) (Figura51).

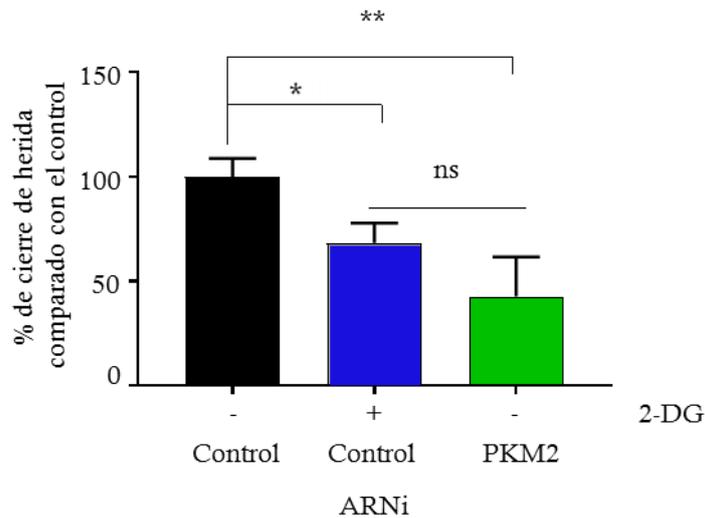


Figura 53. La inhibición de la glucólisis con 2-DG reduce la migración de células endoteliales. Resultado de la cuantificación del porcentaje de área de la herida que ha desaparecido debido a la migración de las células endoteliales, normalizado frente a las células control. Se utilizó el análisis de la t de student de dos colas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. $n=4$.

4.5.3. Estudio de las uniones endoteliales en células tratadas con el inhibidor de la glucólisis 2-DG.

Analizamos la morfología de Ve-cadherina con el tratamiento con 2-DG. Tratamos con el inhibidor durante 24 horas y fijamos las células para analizar por inmunofluorescencia el patrón de las uniones endoteliales, en condiciones basales, y en células tratadas con S1P (1 μ M 15 min

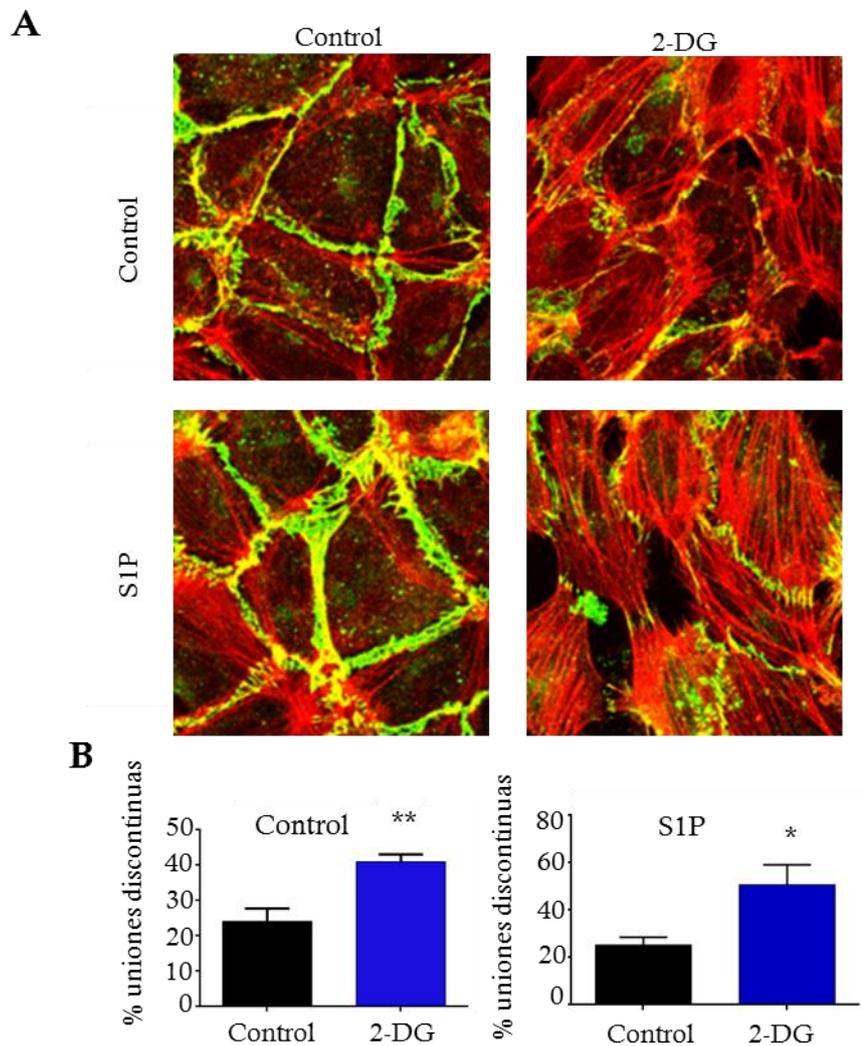


Figura 52. La inhibición de la glucólisis con 2-DG afecta a las uniones endoteliales. A) Imágenes de microscopía confocal de máximas proyecciones en las que se muestra la tinción de Ve-cadherina (verde), PKM2 (rojo), en células control, y en células tratadas con S1P (1 μ M 15 min). **B)** Cuantificación del porcentaje de uniones discontinuas en ambas condiciones. Se normalizó frente al

control en ambos casos. Se analizó estadísticamente con el test de t de student pareado. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$ $n=3$.

En la imagen mostrada en la [Figura 52](#) se puede observar cómo las uniones endoteliales se encuentran afectadas con el tratamiento con el inhibidor, lo que se refleja en el aumento del porcentaje de uniones discontinuas.

Por lo tanto, podemos concluir que existen diferencias dependiendo de la altura a la que se inhiba la glucólisis. Al inhibir PKM2, afectamos a la migración y a la regulación de las dinámicas de las uniones endoteliales, mientras que al inhibir en la parte alta de la vía, afectamos, además de a esos dos procesos, a la proliferación de las células endoteliales.

5. Papel de PKM2 en la angiogénesis in vivo.

5.1. Interferencia de PKM2 en el modelo de desarrollo vascular en la retina neonatal de ratones.

Para comprobar que los defectos en las funciones de las células endoteliales observados tras el silenciamiento de PKM2 eran reproducibles en un modelo animal, decidimos usar el modelo de desarrollo del plexo vascular de la retina en ratones neonatos. Utilizamos para ello la inyección intraocular de ARNi, para analizar posteriormente el desarrollo de la angiogénesis. El ojo izquierdo fue inyectado con un ARN de interferencia control, y el ojo derecho con el ARNi contra PKM2.

En primer lugar analizamos el silenciamiento mediante Western Blot. Extrajimos lisados proteicos de retinas inyectadas con ARNi específico contra la isoforma PKM2 de ratón y sus respectivos controles, para así poder analizar la expresión de PKM2 comprobando la eficiencia de la interferencia. Las retinas fueron inyectadas intravítreamente a día 3 (P3), y analizadas a día 6 (P6).

Las retinas de los ojos inyectados con el ARNi contra la isoforma de piruvato quinasa M2 presentan menor expresión que los ojos inyectados con el ARNi control. La expresión de PKM1, por su parte, no varió (Figura 53).

Por otra parte, estudiamos por inmunofluorescencia la disminución de la expresión de PKM2. Para excluir la expresión de PKM2 en el resto de células de la retina, realizamos en cada una de las secciones confocales una máscara en la señal de IsolectinaB4. Al analizar la expresión de PKM2 que está dentro de la señal del marcador de endotelio vascular isolectina, podemos observar cómo en las retinas que han sido inyectadas con el ARNi contra PKM2 la intensidad de fluorescencia es mucho menor.

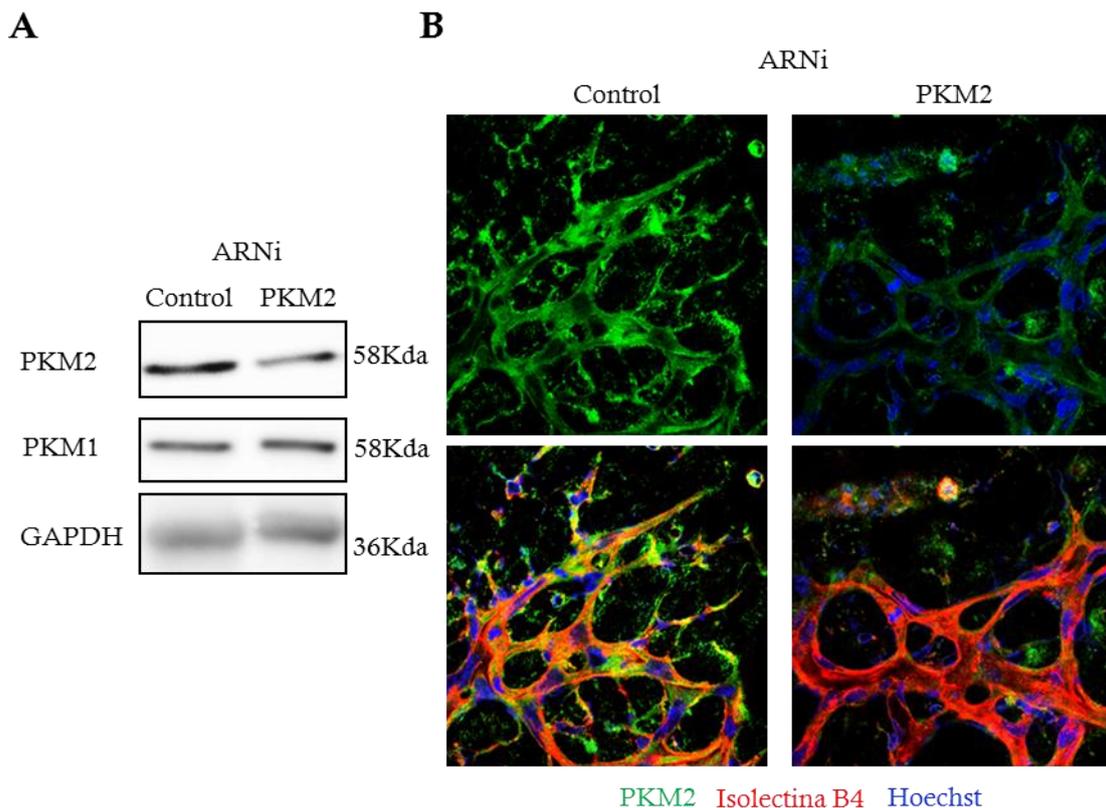


Figura 53. La interferencia de PKM2 en retinas de ratones neonatal a día 6 reduce la expresión de PKM2 .A) Western Blot representativo en el que se analiza la interferencia de PKM2. Se analizó la expresión de las proteínas PKM2, PKM1 y GAPDH como control de carga. **B)** Máximas proyecciones de microscopía confocal en las que se muestra la expresión de PKM2 (verde), en los vasos sanguíneos, mediante la realización de una máscara en la señal de Isolectina (rojo). Los núcleos aparecen teñidos con Hoechst (azul).

5.1.1. Estudio de parámetros vasculares en las retinas interferidas para PKM2.

Analizamos diferentes parámetros para estudiar si la expresión de PKM2 afectaba al desarrollo vascular de la retina. En primer lugar analizamos el crecimiento radial de los vasos, es decir, la distancia que han avanzado desde el nervio óptico

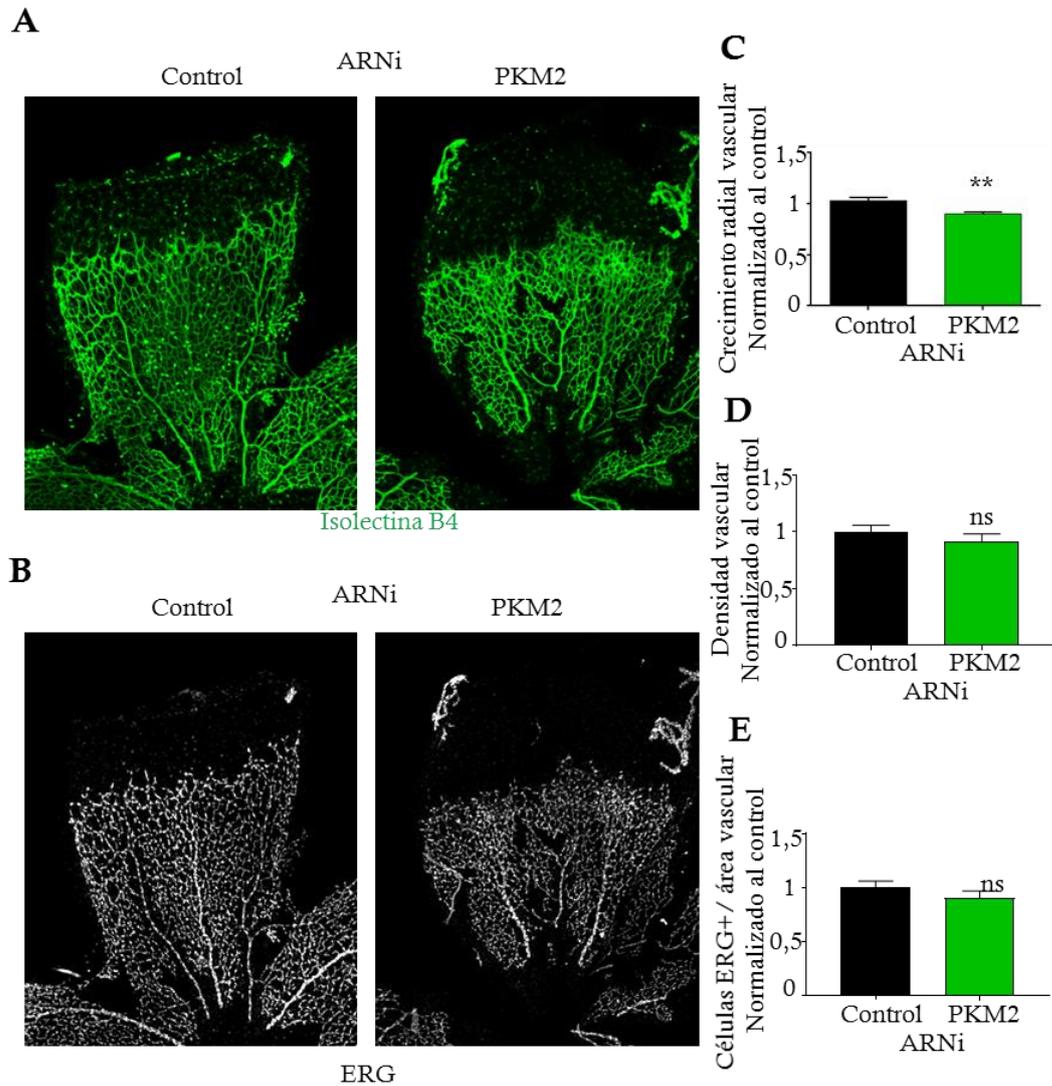


Figura 54. El crecimiento radial vascular de las retinas interferidas para PKM2 es menor, pero la complejidad vascular no varía. **A)** Máximas proyecciones de microscopía confocal de retinas, en las que se observan los vasos sanguíneos mediante la señal de IsolectinaB4 (verde). **B)** Máximas proyecciones confocales de retinas, en las que se observan las células endoteliales mediante el marcador ERG. **C)** Cuantificación del crecimiento radial vascular en la retina. ** $p < 0,01$. $n = 8$ ratones. **D)** Cuantificación de la densidad vascular en la retina. Ns: no significativo $n = 4$ ratones **E)** Cuantificación del número de células ERG+ por área vascular. Ns: no significativo. $n = 4$ ratones.

Las retinas interferidas para PKM2 presentaron una disminución en el crecimiento radial vascular, en comparación con las retinas controles (Figura 54A y C).

Estudiamos también otros valores, como la densidad vascular, es decir, el porcentaje ocupado por vasos sanguíneos en la retina, así como las células endoteliales por área vascular mediante el marcador ERG. Todos estos parámetros nos proporcionan información sobre la complejidad del plexo vascular desarrollado y la proliferación.

Las retinas interferidas para PKM2 no presentaron diferencias en todos esos valores con respecto a las retinas control. Tanto la densidad como el número de células ERG+ no eran diferentes a las retinas control (Figura 54 B, D y E).

5.1.2. Estudio de los filopodias en los vasos sanguíneos de retinas interferidas para PKM2.

Analizamos el número de filopodias de las células de la punta en el frente del plexo vascular en desarrollo de la retina. Para cuantificarlos, contamos las filopodias, normalizando por cada 100 μm , que es el perímetro medio de las células de la punta (Wilhelm et al, 2016).

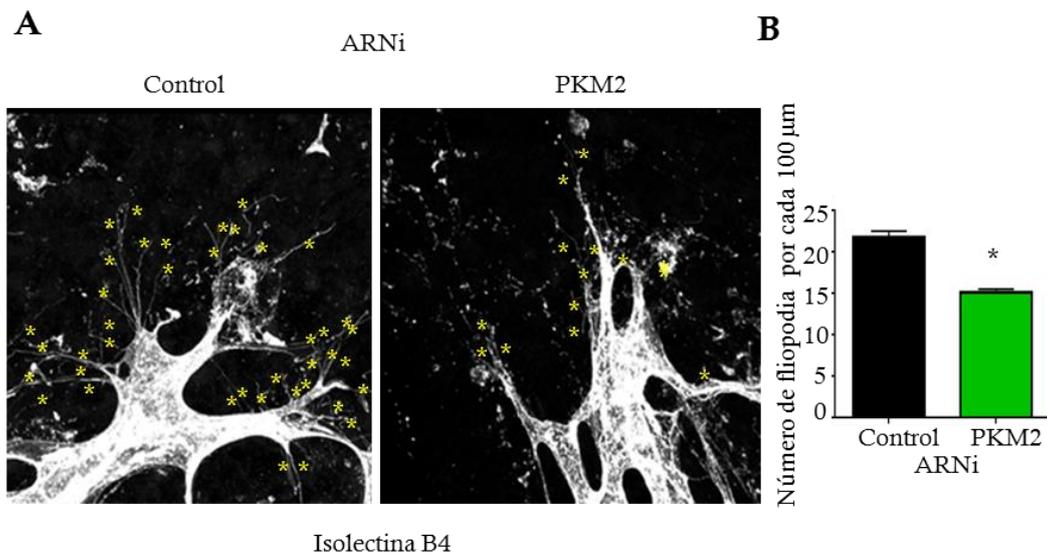


Figura 55. Reducido número de filopodia de las células endoteliales en retinas interferidas para PKM2. A) Máximas proyecciones de microscopía confocal de retinas, en las que se observan los vasos sanguíneos mediante la señal de IsolectinaB4 (verde). **B)** Cuantificación del número de filopodia por cada 100 μm. * $p < 0,05$. $n = 4$

Las retinas de los ojos inyectados con el ARNi para PKM2 presentaban menor número de filopodias que las retinas control (Figura 55).

5.1.3. Estudio de la morfología de las uniones endoteliales en los vasos sanguíneos de retinas interferidas para PKM2.

Para poder realizar el análisis de la morfología de las uniones endoteliales del plexo vascular de la retina, utilizamos el algoritmo de la clasificación del tipo de patrón de Ve-cadherina, de la misma forma que lo habíamos usado en el análisis de las uniones celulares de los ensayos de microesferas, o en el ensayo de migración (Figura 56A y B).

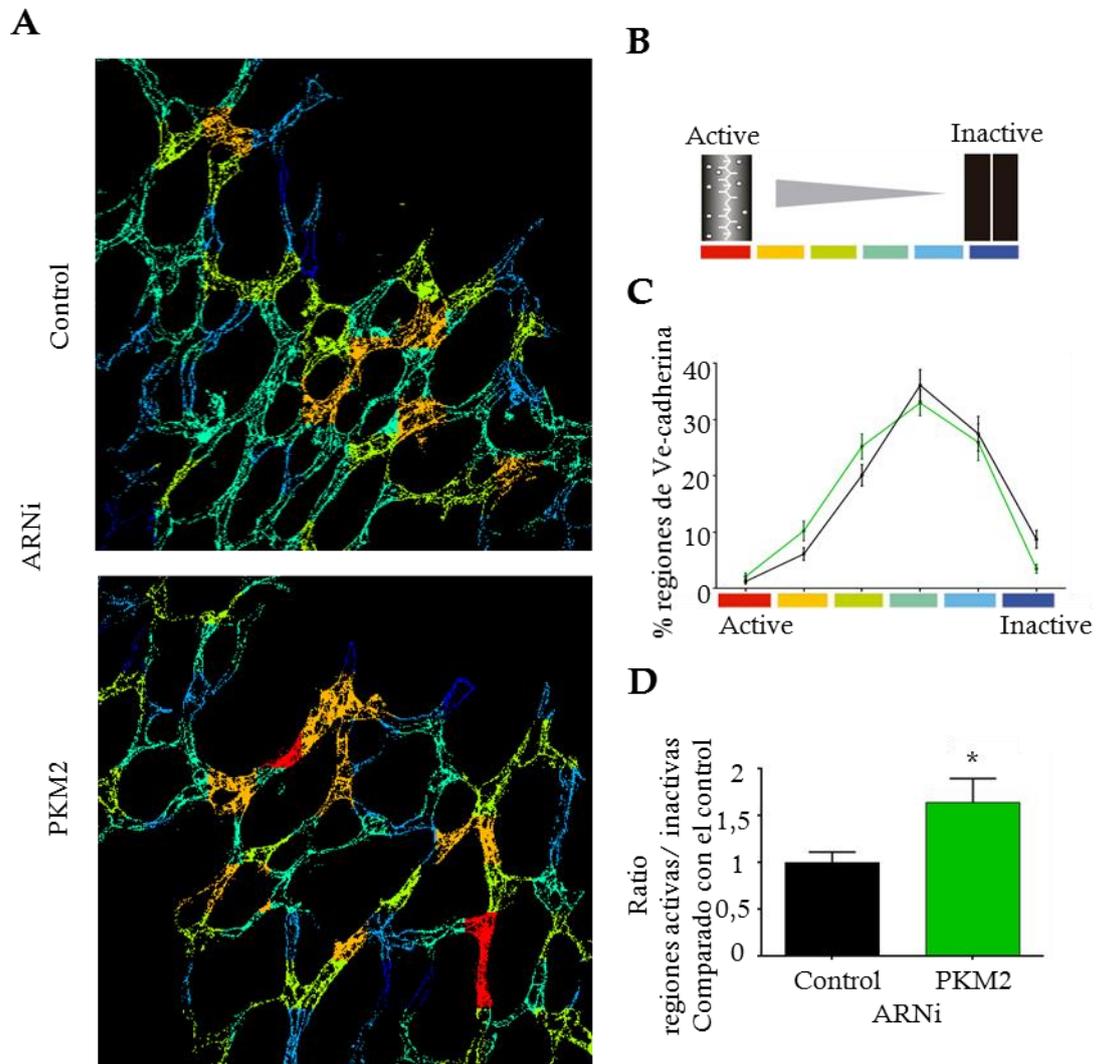


Figura 56. El patrón de morfología de Ve-cadherina en vasos sanguíneos de retinas interferidas para PKM2 refleja un aumento de uniones activas. A) Reconstrucción con la clasificación del patrón de uniones a partir de inmunfluorescencias de Ve-cadherina en retinas. **B)** Clave de clasificación. **C)** Gráfico de la cuantificación del porcentaje de regiones de cada tipo de morfología. **D)** Cuantificación del ratio activo/inactivo. Se realizó el test t de student de dos vías. * $p < 0,05$. $n=8$

La clasificación reveló que las retinas procedentes de ojos inyectados con el ARNi para PKM2, presentaban un mayor porcentaje de uniones irregulares que las retinas controles, y que de hecho el ratio uniones activas/inactivas era mayor (Figura 56 C y D).

Como hemos podido observar, los resultados de los ensayos in vitro se reproducen en el modelo in vivo, en el que la interferencia de PKM2 afecta al desarrollo vascular, en la remodelación de las uniones endoteliales, y en el número de filopodias.

5.2. Estudio de la inhibición de la actividad de PKM2 en el modelo de desarrollo vascular en la retina neonatal de ratones.

Ya que en las células endoteliales la inhibición de la actividad de PKM2 reproducía los defectos de su interferencia, quisimos comprobar si así ocurría también en el desarrollo vascular neonatal en las retinas de los ratones. Para ello inyectamos shikonina 40 μM μM a día 5, y analizamos las retinas a día 6. En los ojos izquierdos, utilizados como controles, inyectamos DMSO.

5.2.1. Estudio de los parámetros vasculares en los vasos sanguíneos de retinas de ojos inyectados intravítreamente con shikonina.

El análisis de plexo vascular reveló que el tratamiento con shikonina disminuía el crecimiento radial (Figura 57A y C). Por otro lado la densidad vascular y el número de células ERG+ por área vascular se encontraban al mismo nivel que las retinas tratadas con DMSO (Figura 57B, D y E).

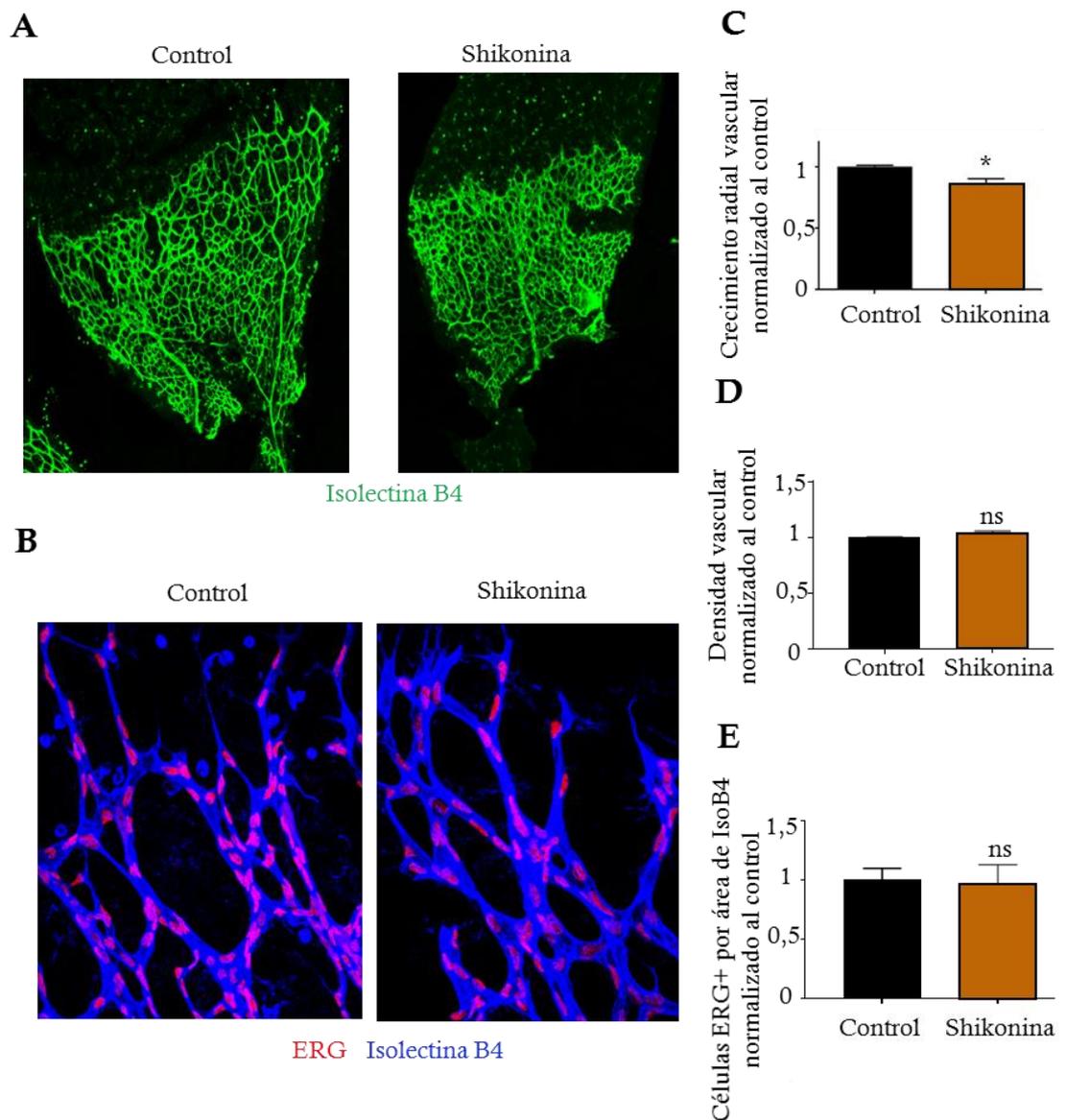


Figura 57. El crecimiento radial vascular de las retinas tratadas con shikonina es menor. A) Máximas proyecciones de microscopía confocal de retinas, en las que se observan los vasos sanguíneos mediante la señal de IsolectinaB4 (verde). **B)** Máximas proyecciones de microscopía confocal de retinas, en las que se observan las células endoteliales mediante el marcador ERG en rojo, contrastado con isolectina en azul. **C)** Cuantificación del crecimiento radial vascular. **D)** Cuantificación de la densidad vascular en los vasos sanguíneos de las retinas tratadas con Shikonina y sus controles tratados con DMSO. **E)** Cuantificación del número de células ERG positivas por área vascular. * $p < 0,05$. ns: no significativo. $n=6$.

5.2.2. Estudio de los filopodias en los vasos sanguíneos de retinas de ojos inyectados intravítreamente con shikonina.

Analizamos el efecto que produce el tratamiento con el inhibidor de la actividad de PKM2 en el desarrollo de protrusiones en las células de la punta de la retina. El número de filopodias por cada 100 μm resultó afectado en las retinas tratadas con shikonina (Figura 58).

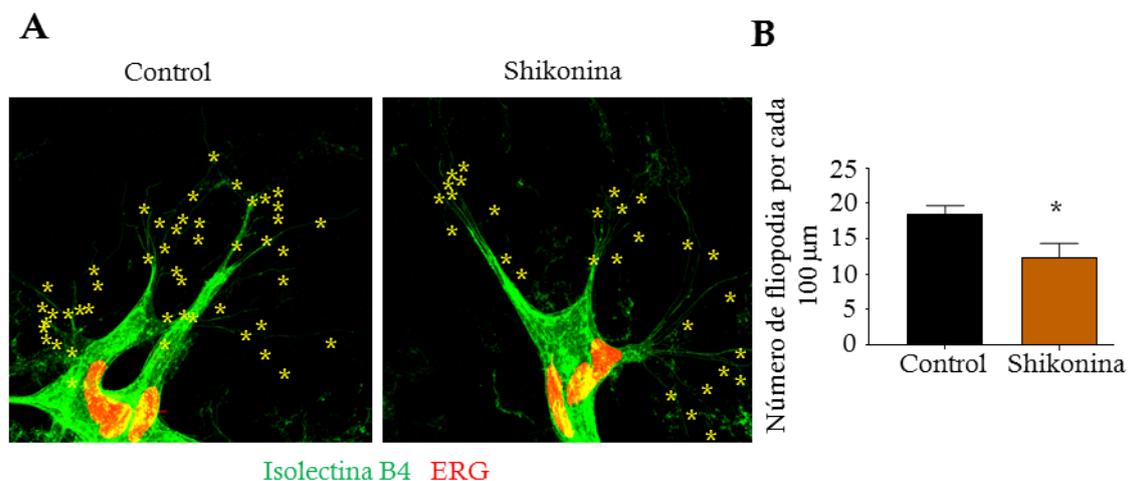


Figura 58. Reducido número de filopodias de las células endoteliales en retinas tratadas con shikonina. A) Máximas proyecciones de microscopía confocal de retinas, en las que se observan los vasos sanguíneos mediante la señal de IsolectinaB4 (verde). **B)** Cuantificación del número de filopodia por cada 100 μm . * $p < 0,05$. $n = 3$.

5.2.3. Estudio de las uniones endoteliales en los vasos sanguíneos de retinas de ojos inyectados intravítreamente con shikonina.

Finalmente estudiamos si el patrón de las uniones endoteliales se vería afectado por el tratamiento con shikonina. Para ello, utilizamos el algoritmo de la clasificación del tipo de patrón de Ve-cadherina, de la misma forma que lo habíamos usado anteriormente (Figura 59A y B).

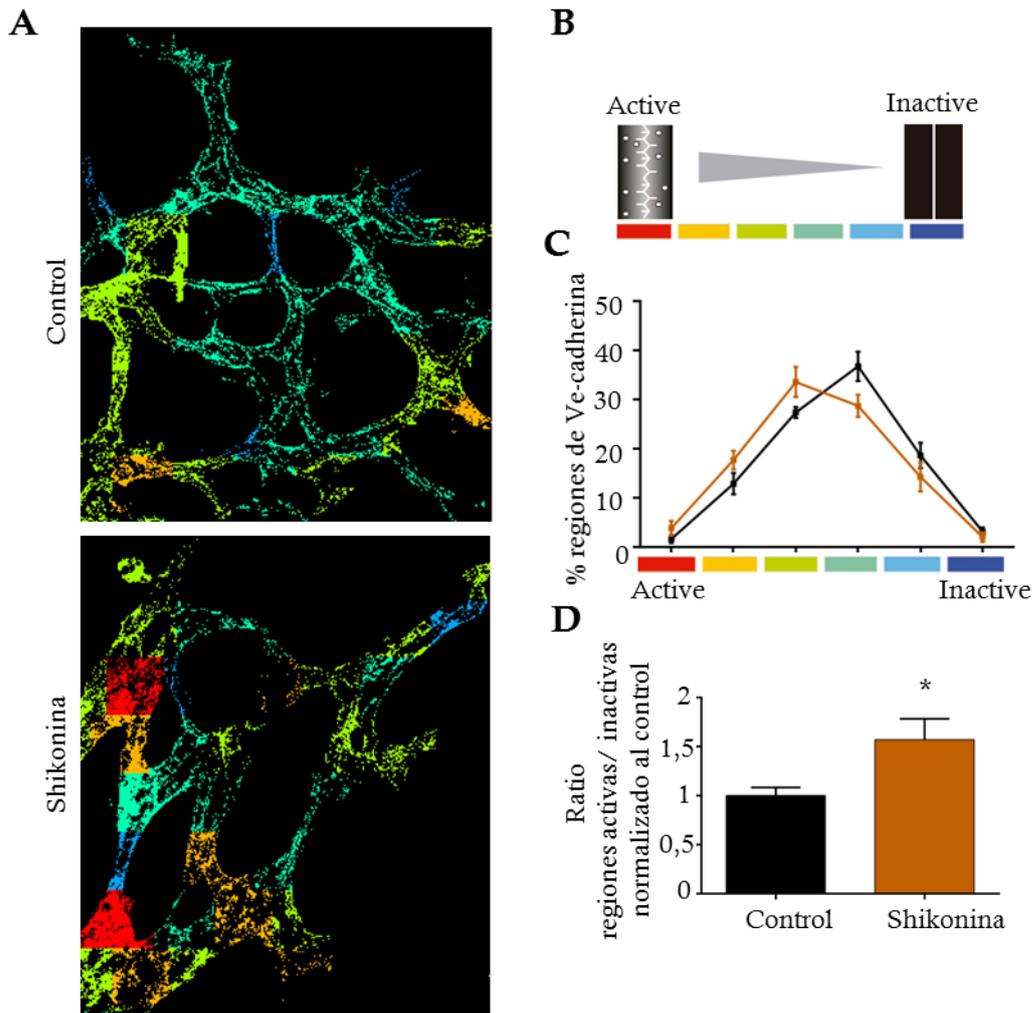


Figura 59. El patrón de morfología de Ve-cadherina en vasos sanguíneos de retinas tratadas con shikonina refleja un aumento de uniones activas. **A)** Reconstrucción con la clasificación del patrón de uniones a partir de inmunofluorescencias de Ve-cadherina en retinas. **B)** Clave de clasificación. **C)** Gráfico de la cuantificación del porcentaje de regiones de cada tipo de morfología. **D)** Cuantificación del ratio activo/inactivo. * $p < 0,05$. $n=4$;

La clasificación reveló que las retinas procedentes de ojos inyectados con Shikonina, presentaban un mayor porcentaje de uniones irregulares que las retinas controles, ya que la curva de clasificación se encontraba desviada hacia la izquierda. Comprobamos además que el porcentaje que de hecho el ratio uniones activas/inactivas era mayor (Figura 59 C y D).

Por lo tanto, el tratamiento con Shikonina, el inhibidor de la actividad de PKM2, compromete la formación de filopodias y la dinámica de uniones endoteliales, sin que la proliferación se vea afectada, tal como se deduce del hecho de que no existan diferencias en el número de células positivas para el marcador endotelial ERG, ni en la densidad vascular. Estos datos coinciden con el efecto de la interferencia de PKM2.

Discusión

En este trabajo hemos descrito la importancia de la expresión y actividad de PKM2 en el endotelio para el desarrollo de una angiogénesis correcta. Además se ha desentrañado qué procesos celulares implicados en la formación de vasos sanguíneos son regulados por esta proteína en células endoteliales, y cómo la forma de regularlo es mediante la aportación de energía en forma de ATP en las regiones celulares próximas a las uniones endoteliales. Ahora procederemos a realizar una síntesis de los resultados, discutiendo su concordancia, discordancia y relevancia con respecto a lo que está descrito en la literatura.

1. Expresión de PKM2 en células endoteliales.

Hemos hallado que las células endoteliales expresan la isoforma 2 de PKM (PKM2) preferentemente en comparación con PKM1 (Figura 12). En la literatura menos reciente siempre se había descrito que PKM2 se expresa fundamentalmente en el embrión y en células cancerígenas, mientras que en el organismo adulto la expresión predominante era de PKM1 (Kumar et al, 2007; Mazurek 2011). Incluso en muchos trabajos no tan lejanos en el tiempo se argumenta en este sentido, pero, sin embargo, estudios recientes han concluido que esa afirmación era equivocada.

Análisis en diferentes órganos han determinado que existe un patrón de expresión de isoformas de PKM propio de cada uno de ellos (Taniguchi et al, 2015), de tal forma que el cerebro, el corazón y el músculo esquelético expresan fundamentalmente la isoforma M1, mientras que órganos como el pulmón, el bazo, el riñón o el intestino delgado expresan la isoforma M2. En otros órganos, como el estómago o el colon, no parece que haya una predominancia de ninguna de ambas isoformas, y en otros, como el hígado, ni siquiera es una isoforma M. ¿A qué se debe esta diferente expresión de una u otra isoforma dependiendo del órgano? El mecanismo ya ha sido descrito, ya que represores y micro ARN que regulan la expresión de uno u otro exón del gen tienen una expresión característica dependiendo del órgano que tratemos (Taniguchi et al, 2015). Sin embargo, queda por desentrañar cuál es la razón y las consecuencias de la expresión de una u otra isoforma.

Ya que la principal diferencia entre PKM1 y PKM2 es la capacidad de regular su actividad catalítica, todo apunta a que la explicación de esa diferente expresión debe estar relacionada con ello. El corazón y el músculo son órganos en los que se produce un gasto de energía constante, por lo que la expresión de la isoforma M1, que es constantemente activa, podría explicarse por esa circunstancia. En los cardiomiocitos del corazón la forma de obtención de energía en forma de ATP es mediante la oxidación fosforilativa en la mitocondria, que obtiene sus sustratos de la oxidación de ácidos grasos (Lopaschuk and Jaswal, 2010). La preferencia por la expresión de PKM1 podría contribuir a que tengan ese tipo de metabolismo.

El cerebro es un órgano metabólicamente peculiar, en el que el destino metabólico de la glucosa depende del tipo celular. Las neuronas degradan activamente la enzima activadora de la glucólisis PFKFB3, mientras que es expresada en los astrocitos (Herrero-Méndez et al, 2009). La expresión de las isoformas de PKM también es diferente en estos dos tipos celulares, ya que, mientras que las neuronas expresan preferentemente PKM1, los astrocitos expresan PKM2 (Zheng et al, 2016). Estos cambios provocan dos cosas, la primera, que la expresión de PKM1 hace que las neuronas presenten una preferencia por la oxidación fosforilativa en la mitocondria, y la segunda, que la menor expresión de PFKFB3 permita que el flujo de metabolitos de la glucólisis sean utilizados para producir poder reductor para combatir el estrés oxidativo. Los astrocitos, que expresan PKM2, por su parte, son altamente glucolíticos (Turner and Adamson, 2011).

Las células endoteliales obtienen su energía en forma de ATP fundamentalmente de la glucólisis anaeróbica a pesar de la alta disponibilidad que tienen de oxígeno, lo que se conoce como el “efecto Warburg”(deBock et al, 2013), mientras que la fosforilación oxidativa es reducida, y la función de las mitocondrias es producir metabolitos para la síntesis de nucleótidos a fin de favorecer la proliferación endotelial en el contexto de angiogénesis (Schoors and Bruning et al, 2015).

La mayor expresión de PKM2 que hemos encontrado en HUVECs parece estar en concordancia con esos hallazgos, ya que, como se ha visto, en neuronas la preferencia por PKM1 hace que el flujo de ATP se desvíe a la fosforilación oxidativa

en la mitocondria. Así, las células endoteliales expresando PKM2 producen su energía mediante la ruta de la glucólisis anaerobia, mientras que la actividad de la mitocondria serviría como surtidor de metabolitos para la proliferación endotelial. De hecho, el consumo de oxígeno no varía con la interferencia de la expresión de PKM2 (Figura 42). Es de señalar, en referencia con estos datos, que en nuestro modelo de interferencia no tenemos variaciones en la expresión de PKM1 (Figura 14), por lo que ese cambio entre una y otra isoforma que se produce en las neuronas (Zheng et al, 2016) y que provoca la preferencia de ese tipo celular por la fosforilación oxidativa no ocurre en nuestras células.

Por lo tanto, la expresión de PKM2 en células endoteliales contribuye a que la fuente de energía de estas células sea la glucólisis anaerobia, y que la mitocondria no contribuya prácticamente a esta producción, proveyendo únicamente de metabolitos para la proliferación.

Queda por determinar si la expresión de las isoformas de PKM en células endoteliales es común a todo el organismo, o varía dependiendo del tipo de órgano, ya que el estudio en el que se determinó la expresión diferente se realizó sin profundizar en los diversos tipos celulares que forman parte de los órganos. El endotelio es muy heterogéneo (Aird, 2012), presentando un alto grado de diferenciación en el cerebro (barrera hematoencefálica), o en el hígado, en el que el endotelio es sinusoidal (Koudelkova et al, 2015), por lo que no sería del todo sorprendente que hubiera un patrón diferente de expresión de las isoformas de PKM en el endotelio dependiendo del órgano de estudio.

Aún queda por determinar qué ocurre en quiescencia y angiogénesis con la regulación de la expresión de PKM2. SIRT1 es una molécula que funciona como una lisina desacetilasa que regula múltiples proteínas, entre ellas FOXO1, un factor de transcripción que modula la expresión de diversos genes que afectan al desarrollo vascular, entre los cuales se encuentran proteínas del metabolismo (Oellerich and Potente, 2012). FOXO-1 promueve la quiescencia de las células endoteliales, disminuyendo la expresión de enzimas metabólicas, entre las que se encuentra PKM2, provocando la reducción del metabolismo tanto de la glucólisis como de la

mitocondria (Wilhelm et al, 2016). SIRT1 reprime la acción de FOXO-1 durante el desarrollo vascular (Potente et al, 2007). En neoplasias de páncreas, SIRT1 estimula la expresión de PKM2, lo que provoca un aumento en proliferación (Pinho et al, 2016).

No está demasiado claro cómo es la regulación en el contexto angiogénico. Myc es un factor de transcripción esencial para el desarrollo vascular (Baudino et al 2002). Entre sus múltiples funciones, se encuentra la activación del metabolismo endotelial promoviendo la síntesis de diferentes enzimas, entre las que se encuentra PKM2 (Wilhelm et al, 2016). Por otra parte, Myc media las respuestas de ciertas moléculas que estimulan la angiogénesis, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), incrementando la expresión de enzimas de la glucólisis como HK-2 en HUVECs, aunque no PKM2 (Yu et al, 2017). PFKFB3, por otro lado, incrementa su expresión con el tratamiento con VEGF-A (deBock et al, 2013). Aunque nosotros no hemos encontrado variaciones en los cultivos de HUVECs de la expresión de PKM2, no habría que descartar que pueda verse afectada en un contexto angiogénico en el que las células se encuentran en otro ambiente y circunstancias.

2. La expresión y actividad de PKM2 no influye en la proliferación de las células endoteliales.

Las células endoteliales se encuentran en un estado menos activo durante la homeostasis del organismo. Solamente cuando reciben un estímulo o experimentan algún tipo de estrés, se activan y responden con cambios en su fisiología, mecanismos celulares y en su metabolismo, que les permiten entre otras cosas comenzar a dividirse. Con respecto a este último punto, como se ha descrito en la introducción, condiciones típicas de homeostasis, como el flujo laminar, provocan una reducción de ciertas enzimas del metabolismo como PFK1, HK2 o PFKFB3 (Doddaballapur et al, 2015). Todas estas enzimas pertenecen al curso alto de la glucólisis, cuando los metabolitos procesados tienen aún seis carbonos. Si se encontraron diferencias en la expresión de PKM2, se desconoce.

No hemos hallado diferencias en la expresión de PKM2 o PKM1 a lo largo de las diferentes fases celulares de proliferación (Figura 13). Se ha descrito que la expresión de PKM1 reduce la proliferación (Lunt et al, 2015) o que en el cerebro las partes proliferativas durante el desarrollo expresan PKM2 y que su expresión cambia a PKM1 durante la diferenciación y que esto se acompaña con la reducción en proliferación (Zheng et al, 2016; Tech et al 2017). Sin embargo este cambio de expresión, que se creía que ocurría también en la transformación de una célula en célula tumoral, y que provocaba que, entre otras cosas, comenzase a proliferar, ha sido discutido (Zhan et al, 2015). Además, en muchos órganos celulares la isoforma expresada de forma predominante es PKM2 (Bluemlein et al, 2011; Taniguchi et al, 2015), lo cual no quiere decir que las células de ese tejido estén proliferando constantemente. De hecho, nosotros no hemos observado defectos en proliferación asociados con la interferencia de la expresión de PKM2, ni en células en cultivo (Figuras 14 y 15), ni en el ensayo de cierre de herida (Figura 17), ni en estudios angiogénicos “in vitro” o “in vivo” (Figuras 29 y 54). Además, no hemos observado una compensación con la expresión de PKM1, por lo que podemos excluir estos efectos del fenotipo de proliferación asociado a PKM2.

Una explicación para que la expresión de las isoformas no afecte a la proliferación es que la regulación de la actividad de PKM2 sea responsable de ese fenotipo, ya que la inhibición de la actividad de PKM2 contribuye a la proliferación en células tumorales (Hitosugi et al, 2009), mientras que el incremento de la actividad mediante la promoción de la forma tetramérica de PKM2 inhibe la proliferación celular tumoral (Anastasiou et al, 2012). Nosotros hemos observado que la inhibición de la actividad de PKM2 no afecta a la proliferación de las células endoteliales con el tratamiento con shikonina, tanto en células en cultivo (Figura 46), como en la angiogénesis “in vivo” (Figura 57). Además, en concordancia con estos resultados, encontramos que la actividad de piruvato quinasa está reducida en la fracción citosólica de las células endoteliales, en comparación con la actividad en las regiones citoesqueléticas-membranales (Figura 44), lo que podría reflejar que la reducida actividad en el citosol permite el flujo de metabolitos intermediarios de la glucólisis hacia la formación de macromoléculas necesarias para la proliferación celular. Así, la inhibición de la actividad, o la interferencia, no afectaría en exceso a ese flujo de metabolitos, lo que permitiría que las células endoteliales continuasen dividiéndose.

Se ha descrito que células endoteliales deficientes en enzimas del metabolismo, como PFKFB3 o HK2, presentan defectos en proliferación (deBock et al, 2013; Yu et al, 2017), además de que la inhibición general de la glucólisis con 2-deoxiglucosa también produce defectos en este proceso (Figura 50), lo que pone de relieve, junto con nuestros resultados acerca de PKM2, que la regulación de una u otra enzima de la glucólisis puede alterar diferentes procesos o no, como en este caso la proliferación.

3. PKM2 en la regulación de la migración de las células endoteliales.

Hemos descrito cómo las células endoteliales interferidas para PKM2, o en las que su actividad se encontraba inhibida, presentaban defectos en su capacidad migratoria (Figuras 16 y 46). No es la primera enzima en la que se observa que tiene un papel en la migración de las células. La expresión de PGK1, otra enzima de la glucólisis que genera ATP directamente como la piruvato quinasa, es importante para la migración de células tumorales (Li and Xiang et al, 2016). El silenciamiento de GAPDH en fibroblastos de córnea, por su parte, disminuye el porcentaje de área ocupada en el ensayo de cierre de herida (Joseph et al, 2014).

En células endoteliales se habían descrito defectos en ratones deficientes para PFKFB3 (deBock et al, 2013) o en células endoteliales linfáticas de ratones deficientes para HK2 (Yu et al, 2017).

En el caso de PKM2 se había descrito su papel favoreciendo la migración en células de cáncer de colon (Yang et al, 2015) o en células de cáncer de estómago (Wang et al, 2017), aunque también se ha observado que en células de hepatocarcinomas puede inhibirla (Chen et al, 2015). El papel de esta isoforma en ese órgano en concreto parece peculiar, ya que a pesar de que la depleción de PKM2 está ampliamente relacionada con un descenso en el crecimiento tumoral, en un ratón deficiente en PKM2 se generan más cantidad de carcinomas de células hepáticas (Dayton et al, 2016). Hay que señalar que ese modelo de deficiencia de PKM2 presenta una

compensación de expresión de PKM1 (Israelsen et al, 2013), lo que podría estar condicionando las respuestas observadas en ese ratón. El papel de PKM1 en la migración celular ha sido apenas descrito, ya que debido a que la mayoría de trabajos se han desarrollado en células tumorales, se ha enfocado la investigación en la isoforma M2. Sin embargo, en uno de los estudios antes mencionados (Yang et al, 2015), PKM1 no promovía la migración de células de cáncer de colon. En células endoteliales no existen datos previos al respecto de la función de PKM2 o PKM1 en la migración celular.

El mecanismo por el que puede afectar a este proceso podría ser la producción de ATP en las regiones de membrana donde se generan las protrusiones en células endoteliales. Hemos descrito la presencia de PKM2 en los lamelipodios de células en cultivo (Figura 36), en los filopodios de las estructuras tubulares “in vitro” (Figura 41), y en los de las células de la punta de las retinas (Figura 53). Además, la interferencia de PKM2 afecta al número de filopodios en las retinas, reduciéndolos (Figura 55). Sin embargo podría deberse también a que la regulación de las uniones endoteliales se encontrase afectada, como hemos observado en este trabajo (Figuras 23,24 y 25). Las dinámicas de las uniones es importante para una correcta migración colectiva (Hayer et al, 2016), por lo que PKM2 podría estar afectando en parte a la migración a través de este proceso. De la función de PKM2 en las uniones se discutirá más adelante.

La formación de protrusiones es fundamental para el correcto desarrollo vascular (Wakayama et al, 2015; Fantin et al, 2015), y en multitud de trabajos en los que hay defectos en la angiogénesis en la retina, hay defectos en el número de filopodios. Las funciones de los filopodios son: ayudar a la dirección de la migración (Phng et al, 2013), la interacción con otros tipos celulares en el proceso de avance de los vasos y la formación de anastomosis entre la célula de la punta de diferentes vasos (Gerhardt et al, 2003), proceso en el cual es importante la función de Miosina X transportando agregados de Ve-cadherina para iniciar los contactos entre las células, mecanismo que requiere de ATP para viajar a través del filopodia (Almagro et al, 2010). La formación de filopodios requiere además de la disponibilidad de actina unida a ATP, que es un factor limitante para su longitud y estabilidad (Zhang et al, 2004).

PKM2 podría proveer ATP para las dinámicas del citoesqueleto que son necesarias para la migración. El descenso de actividad de la piruvato quinasa por la interferencia de PKM2 (Figura 43) provoca una reducción en los niveles de ATP en la fracción citoesquelética-membranal (Figura 45), lo que podría contribuir a los defectos observados en migración, y en los filopodia de las retinas. Además, este defecto ocurre también en las retinas tratadas con un inhibidor de la actividad de PKM2 (Figura 58). La asociación descrita entre PKM2 y la F-actina (Puchulu-Campanella et al, 2013) podría ser la responsable de que se encuentre en esas regiones produciendo ATP. De hecho, solamente se ha descrito la asociación directa de PFK, Aldolasa, GAPDH, piruvato quinasa (Menard et al, 2014) y PFKFB3 (deBock et al 2013) con F-actina. Las otras proteínas de la glucólisis podrían asociarse uniéndose a adaptadores o a otras enzimas que se pueden unir a estructuras citoesqueléticas, como es el caso de PGK que se une a GAPDH, que sí tiene esa capacidad (Zala et al, 2013). Por otra parte, se ha demostrado la asociación entre PKM2 y la cadena ligera de la miosina 2 (MLC2) en otro contexto, por lo que habría que determinar si pudiera ocurrir en otras circunstancias (Jiang et al, 2014).

Otra posibilidad que podría contribuir a la regulación de la migración por parte de PKM2, es que ésta contribuyese con ATP para la fosforilación de proteínas implicadas en este proceso celular. PI3K es una quinasa que tiene un papel fundamental en la respuesta migratoria celular (Cain and Ridley, 2009). Para realizar su función, proteínas como AKT son reclutadas a la membrana celular (Gao and Zhang, 2009); Huang et al, 2011). AKT puede fosforilar actina (Xue and Hemmings, 2013), por lo que el ATP necesario para ello podría ser producido por PKM2.

Una ruta que PKM2 podría estar regulando es la de la proteína RAP1, ya que se ha demostrado recientemente su asociación (Onodera et al, 2014). Dado que RAP1 puede regular las dinámicas del citoesqueleto, afectando tanto a la migración (Genova et al, 2017), como a las dinámicas de las uniones endoteliales (Pannekoek et al, 2014), podría ser un mecanismo a explorar.

Por otro lado, podría ser que la actividad como proteína quinasa de PKM2 fuera la que regulase estas funciones en migración, fosforilando proteínas directamente a partir de PEP. Sin embargo, el hecho de que esta función esté discutida (Hosios et al,

2015), y que cuando se ha descrito esta capacidad como proteína quinasa haya sido cuando PKM2 se encontraba localizada en el núcleo (Yang et al 2012; Jiang et al, 2014), hace que sea improbable que pueda tener alguna función directa en este proceso en ese sentido. En concordancia, no hemos detectado apenas células endoteliales con una clara localización de PKM2 en el núcleo en nuestros estudios.

4. PKM2 en la regulación de las uniones endoteliales.

Se ha descrito a lo largo de este trabajo que PKM2 regula las dinámicas de las uniones endoteliales. La interferencia de esta isoforma provoca un aumento del porcentaje de uniones discontinuas (Figura 19). Este tipo de unión se caracteriza por ser uniones inmaduras que no son capaces de estabilizarse, y que además provocan que la función del endotelio como barrera se vea comprometida (Millan et al, 2010; Dejana, 2009). Este mayor porcentaje de uniones discontinuas se mantiene cuando estimulamos las células con una molécula que favorece la remodelación de estas estructuras celulares, como esfingosina 1-fosfato (Figura 20). El hecho de que las células interferidas posean estas deficiencias podría deberse a que sean incapaz de remodelar sus uniones de forma adecuada. En línea con esta afirmación, se encuentra el hecho de que en los ensayos del estudio de la resistencia eléctrica transendotelial, las células interferidas tratadas con S1P incrementaban sus valores de resistencia, pero en unos niveles mucho más reducidos que las células interferidas control (Figura 22).

Mediante una observación más detallada del fenotipo morfológico de las células interferidas tratadas para PKM2 tratadas con S1P (Figura 20), podemos vislumbrar cómo a pesar de que las células adquieren una morfología típica del tratamiento con S1P, los defectos en Ve-cadherina seguían manteniéndose. La respuesta a S1P implica muchos procesos, que se producen de forma encadenada y que finalmente componen el fenotipo observado (Xu et al, 2007). En nuestro modelo no estamos intentando demostrar que PKM2 bloquea todas las respuestas celulares a S1P, sino que el hecho de que PKM2 esté provocando un defecto en las uniones, implica que no responden correctamente al estímulo de S1P. Una confirmación de que son los

defectos en las uniones los que provocan ese fenotipo, es que la localización de otra proteína de ese complejo, como es gamma-catenina, también se encuentra afectada tanto en condiciones basales, como con en el tratamiento con S1P (Figura 21).

Elegimos el tratamiento con S1P, ya que nos parecía más interesante que, si PKM2 producía defectos en las uniones, analizar si se reducían con un estímulo que reforzase la integridad de esas estructuras. De hecho, aunque no se muestre en los resultados, en células tratadas con VEGF-A (50 ng por ml durante 15 minutos), que promueve la aparición de uniones discontinuas (Dejana et al, 2009), la intensidad de Ve-cadherina y el porcentaje de este tipo de unión se encontraban afectados, aunque en menor proporción, ya que de por sí en las células interferidas ya presentaban esos defectos sin ese tratamiento (Figura 19).

Esta regulación deficiente de las uniones endoteliales sucedía también en el ensayo de migración por cierre de herida (Figura 23 y 24). Además de los defectos que producía PKM2 en la regulación de las protrusiones del citoesqueleto, como los filopodias, que podrían contribuir a estos resultados en la migración, el hecho de que las uniones se encuentren también afectadas podría ser responsable del fenotipo observado en migración. De hecho, se ha descrito la necesidad de una correcta regulación de Ve-cadherina en la migración colectiva de las células endoteliales para que éstas se encuentren bien orientadas hacia el lugar al que deben de migrar (Hayer et al, 2016). En este trabajo explican además que estímulos que provocan aumentos de uniones discontinuas, como la trombina, provocan defectos en esta migración colectiva. En nuestro modelo, analizamos las células interferidas para PKM2, hallando que había un mayor porcentaje de células que se encontraban mal orientadas (Figura 25). Este defecto podría estar causado por el defecto en las uniones endoteliales observado en nuestros experimentos.

A pesar de que no hemos encontrado diferencias en la proliferación en nuestros ensayos de migración a consecuencia de la interferencia de PKM2 (Figura 17 y 18), los defectos en las uniones endoteliales podrían estar afectando a ese proceso de otra forma. Recientemente se ha descrito la importancia de la división asimétrica para la migración colectiva de las células endoteliales. Este fenómeno consiste en que las dos células procedentes de la división de la misma célula, se reparten los componentes

de la originaria en una proporción diferente quedando polarizadas, lo que influye en la migración (Costa et al, 2016). La división asimétrica está regulada por la adhesión celular, mediante la asociación de adaptadores de este proceso a las proteínas de la unión, como E-cadherina (Le Borgne et al, 2002; Glocrich et al, 2017). Por todo eso, no podemos descartar un papel de la deficiente regulación de las uniones por parte de PKM2 en este fenómeno, que contribuiría, junto a los defectos en las uniones, en la migración colectiva y al efecto en las protrusiones del citoesqueleto.

Hemos visto que PKM2 se localiza en las uniones celulares, tanto en condiciones basales (Figura 33), como en condiciones de remodelamiento de uniones en el tratamiento con S1P (Figura 35). Además, hemos confirmado la presencia en las regiones de las uniones endoteliales mediante el subfraccionamiento de los compartimentos membranales de las células (Figura 40). También, tras el tratamiento con S1P, podemos observar una mayor presencia en las fracciones de menor densidad de la proteína EEA1, característica a los endosomas tempranos, lo que indica un aumento en el tráfico de proteínas en la membrana plasmática. En los ensayos con la construcción fluorescente de PKM2 (PKM2-GFP), observamos cómo se produce un aumento del tráfico de vesículas de PKM2 en las regiones cercanas a la membrana plasmática (Figura 37). Esto podría indicar una función de PKM2 en el transporte que se produce en la región, o simplemente que es transportada hacia esa zona para regular alguna función localmente.

Todos estos resultados confirman la presencia de PKM2 en situaciones basales, como en modelos dinámicos en los que se remodelan uniones con mayor intensidad. Además, el hecho de que los defectos en las uniones se presenten en ambas situaciones implica un papel de la proteína en la remodelación constante de uniones endoteliales.

Hemos observado que estos defectos en la regulación de uniones endoteliales se reproducen en los ensayos angiogénicos, tanto “in vitro” (Figura 32), como “in vivo” (Figura 56 y 59). En ambos modelos, la interferencia de PKM2 produce una reducción en la formación de nuevas estructuras vasculares. Como se ha comentado en la introducción, aún quedan nociones que aclarar sobre el papel de las uniones endoteliales en la angiogénesis. Parece establecido la necesidad de un mosaico de

patrones de uniones activas e inactivas para una correcta angiogénesis (Bentley et al, 2014). No está claro sin embargo que un aumento de la proporción de uniones endoteliales inactivas se acompañe de defectos en angiogénesis (Li et al. 2016), aunque es cierto que en este modelo, aunque el patrón se derivaba hacia las uniones inactivas, el mosaico entre regiones de Ve-cadherina activas e inactivas se mantenía. El incremento de la proporción de uniones inactivas parece impedir sin embargo otros procesos, como la metástasis, en ese estudio.

Por otro lado, sí que se ha descrito que un incremento de uniones discontinuas provoque defectos en angiogénesis (Wimmer et al, 2012; Yoshioka et al, 2012; Fraccaroli et al, 2015). En estos estudios realizados en diferentes proteínas, como RAF-1, o una proteína de adhesiones focales (alpha-parvin) se correlacionaba los defectos en angiogénesis con una regulación comprometida de las uniones endoteliales.

Otro modelo en el que se produce un aumento en el porcentaje de uniones activas es el tratamiento con el inhibidor del procesamiento de Notch, DAPT (Bentley et al, 2014). En este caso, está descrito que este tratamiento provoca un fenotipo de hipervascularización en el desarrollo vascular de las retinas de ratones (Hu et al 2014), sin embargo, debido a la multitud de cambios celulares que se producen a través del tratamiento de DAPT, no resulta prudente responsabilizar únicamente a la morfología de las uniones celulares de este fenotipo.

El mecanismo propuesto por el que PKM2 podría regular las dinámicas de las uniones es por la producción de ATP de forma local. El hecho de que las uniones tratadas con shikonina, el inhibidor de la actividad de PKM2, sean más inestables corrobora esta hipótesis (Figura 47). Además hemos encontrado menores niveles de ATP en las fracciones citoesqueléticas-membranales de las células interferidas para PKM2 (Figura 45).

En recientes estudios, se ha descrito el papel de la proteína reguladora de la glucólisis PFKFB3 en la normalización de las uniones endoteliales y los filopodias en procesos de angiogénesis patológica. El tratamiento con VEGF en altas concentraciones produce un aumento en las uniones de tipo discontinuo (Bentley et al, 2014; Cruys et al, 2016), que a su vez provoca defectos en la formación de vasos nacientes, que

son reducidos (Ubezio et al, 2016). Al tratar con un inhibidor de la actividad de la proteína PFKFB3, se producía una reducción en el porcentaje de uniones discontinuas, aunque no se describía qué ocurría con el desarrollo vascular en sí (Cruys et al, 2016).

En otro artículo, se ha descrito cómo la inhibición de la actividad de PFKFB3 en células endoteliales tumorales, contribuía a la normalización de las uniones endoteliales, haciendo que fueran menos discontinuas (Cantelmo et al, 2016). Es curioso, porque en un estudio del mismo grupo, las células endoteliales en las que se silenciaba esa proteína establecían uniones de forma temporal y más inestable (movieS1 en deBock et al, 2013). Esas células no experimentan cambios en sus niveles de ATP celulares, ya que adaptan su metabolismo reduciendo su consumo, disminuyendo entre otras rutas, la síntesis de proteínas, de forma que se reduce el ratio ADP/ATP (deBock et al, 2013). La explicación más plausible a ese posible fenotipo dual en la regulación de uniones endoteliales, es que las dinámicas en las uniones requieran unos niveles adecuados de energía para su correcta morfología y estabilidad. De ese modo, un exceso de energía, como ocurre en las células endoteliales provenientes de tumores, que producen más ATP y tienen una mayor expresión de PFKFB3 (Cantelmo et al, 2016), podría producir un exceso de remodelación en las uniones impidiendo que se estabilizaran, y en el caso opuesto, que una reducción del metabolismo impida que las uniones puedan remodelarse y tampoco puedan estabilizarse. En ese sentido nosotros hemos testado la respuesta a la inhibición general de la glucólisis en las uniones endoteliales mediante el tratamiento de HUVECs con 2-deoxiglucosa. El tratamiento generó un aumento de uniones discontinuas e inestables (Figura 52). Además, en otro estudio, la reducción de niveles de ATP en las uniones endoteliales generada por la interferencia de Emmprin, una proteína que forma un complejo junto a plakoglobina en la unión, provocaba que las uniones endoteliales fueran más inestables (Moreno et al, 2014). Además, las células interferidas de este trabajo presentaban defectos a la hora de establecer contactos iniciales entre las células, al igual que se había observado con la interferencia de PFKFB3 (deBock et al, 2013).

En células epiteliales se ha caracterizado qué ocurre con la depleción de ATP en las uniones estrechas. Dos artículos exponen resultados complementarios, que podrían

estar en concordancia con nuestra hipótesis. En el primero de ellos, el tratamiento de las células con 2-DG, el inhibidor de la glucólisis, producía la separación de las células a pesar de que las proteínas de las uniones se mantenían con una intensidad intacta. Además, la resistencia eléctrica transepitelial disminuía con la depleción de ATP, verificando que la regulación del epitelio como barrera se encontraba comprometida. Por otra parte, el citoesqueleto de actina se veía afectado retrayéndose de la unión (Tsukamoto and Nigam, 1997). En el otro trabajo, realizaban una inhibición aún más severa del metabolismo, bloqueando la glucólisis y la fosforilación oxidativa. El resultado era la desorganización del esqueleto de actina, la formación de interrupciones en las uniones entre las células epiteliales (similar a las uniones discontinuas de las células endoteliales) y un marcado descenso en los valores del TEER (Bacallao et al, 1994).

Por otro lado, la adición de ATP extracelular a concentraciones minimolares produce un descenso en los valores del TEER tanto en células epiteliales, como en endoteliales (McClenahan et al, 2009). En ese trabajo indican que es probable que fisiológicamente no se den unas concentraciones tan altas de ATP. Un efecto similar ha sido observado en células endoteliales de cerebro (Maeda et al, 2016).

La explicación del papel del ATP en la regulación de las uniones endoteliales es por tanto compleja. Como se ha indicado anteriormente, las dinámicas del citoesqueleto, y el transporte de Ve-cadherina por parte de miosina X a través de los filopodias requiere ATP (Almagro et al, 2010). La fosforilación de Ve-cadherina, necesaria para la internalización, requiere de ATP como sustrato (Orsenigo et al, 2012). En ese sentido, la endocitosis de E-cadherina es mediada por ATP (Trojanovsky et al, 2006). En el caso del transporte o el reciclaje de Ve-cadherina a la unión, no ha sido investigado profundamente el papel del ATP. Sin embargo, se ha observado que Ve-cadherina parece seguir la ruta de los microtúbulos (Hebda et al, 2013). De hecho, se ha descrito la existencia de un complejo de reciclaje del que forman parte los microtúbulos, y que, al bloquearse, se impide el reciclaje de componentes de uniones a la membrana (Gonzalez et al, 2016). El movimiento de vesículas a través de los microtúbulos requiere de energía, que puede ser proveída por enzimas de la glucólisis asociadas a esas vesículas, como en el caso de GAPDH en el transporte a través de los axones de las neuronas (Zala et al, 2013). Podría ser por tanto que una

desregulación en la producción de ATP que produjera una descompensación de alguno de estos mecanismos, y que esto comprometiera la integridad de las uniones.

5. Discusión final: PKM2 en angiogénesis.

Nuestro modelo final es que PKM2 produce ATP a nivel local en dos regiones de la célula endotelial durante el proceso de angiogénesis. En primer lugar, regulando la producción de filopodias (*Figuras 55 y 58*), afectando a las dinámicas del citoesqueleto. En segundo lugar, mediante la regulación de las dinámicas de Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCA-1) en las uniones, favoreciendo su remodelamiento, pero de una forma moderada, de manera que la estabilidad se mantenga (*Figura 56 y 59*). Ambos procesos favorecerían el avance de los nuevos vasos sanguíneos.

Por otro lado, debido a la menor actividad de piruvato quinasa en el citosol, PKM2 permitiría el desvío de metabolitos a las rutas de síntesis de macromoléculas, facilitando que la proliferación de las células endoteliales para la extensión de los vasos sanguíneos (*Figura 54 y 57*). El hecho de que, a pesar de una mayor presencia de PKM2 en las fracciones del citosol (*Figura 43*), la actividad de piruvato quinasa sea menor que en la fracción citoesquelética-membranal (*Figura 44*), apunta en esa dirección.

Estos hallazgos muestran cómo la regulación de las funciones endoteliales por el metabolismo depende particularmente de la enzima que se trate. Además debido a la importancia de PKM2 en patologías, este trabajo contribuye aportando información sobre el papel que tiene esta molécula en la angiogénesis, lo cual deberá ser tenido en cuenta a la hora de realizar estrategias para desarrollar terapias efectivas contra procesos patológicos como el cáncer.

Conclusiones

1. La isoforma de piruvato quinasa expresada en mayor proporción en células endoteliales humanas es PKM2.
2. La proliferación celular endotelial no está influida por los niveles de expresión ni por la actividad de PKM2.
3. PKM2 regula las dinámicas de las uniones endoteliales afectando a la migración celular y favoreciendo la formación de tubos capilares “in vitro”
4. La actividad de piruvato quinasa es mayor en compartimentos subcelulares citoesqueléticos y membranales que en el citosol.
5. La producción de ATP dependiente de PKM2 también se encuentra compartimentalizada en regiones asociadas a las uniones endoteliales y al citoesqueleto, contribuyendo así a la regulación de las funciones que ocurren en esas zonas.
6. El tratamiento con un inhibidor específico de la isoforma M2 de piruvato quinasa demuestra que la actividad de PKM2 es necesaria para el remodelado de las uniones endoteliales, la migración de células endoteliales y la formación de tubos capilares en modelos “in vitro”
7. PKM2 regula las dinámicas de las uniones endoteliales y la formación de proyecciones del citoesqueleto “in vivo” afectando al crecimiento vascular durante la angiogénesis fisiológica, sin afectar a la proliferación.

1. The pyruvate kinase isoform that is more expressed in human endothelial cells is PKM2.
2. The endothelial proliferation is not influenced by the expression levels neither by the activity of PKM2.
3. PKM2 regulates the endothelial cells dynamics affecting collective cell migration and the sprouting, “in vitro”.
4. The pyruvate kinase activity is higher in cytoskeletal and membranal subcellular compartments than in cytosol.
5. PKM2 dependent ATP production is also compartmentalized at junctional and cytoskeletal associated regions contributing to the regulation of the functions that occur at that places.
6. The treatment with a specific inhibitor of the M2 pyruvate kinase isoform demonstrates that the activity of PKM2 is necessary for the reorganization of endothelial junctions, migration, and sprouting, “in vitro”.
7. PKM2 regulates the junction dynamics and the cytoskeletal protrusions in endothelial cells affecting “in vivo” vascular development in physiological angiogenesis, with no effects in endothelial proliferation.

Bibliografía

Abu Taha, A., M. Taha, J. Seebach, and H. J. Schnittler. 2014. 'ARP2/3-mediated junction-associated lamellipodia control VE-cadherin-based cell junction dynamics and maintain monolayer integrity', *Mol Biol Cell*, 25: 245-56.

Adams, R. H., and K. Alitalo. 2007. 'Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 464-78.

Adhikary, S., and M. Eilers. 2005. 'Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 635-45.

Aebischer, D., M. Iolyeva, and C. Halin. 2014. 'The inflammatory response of lymphatic endothelium', *Angiogenesis*, 17: 383-93.

Aird, W. C. 2012. 'Endothelial cell heterogeneity', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a006429.

Almagro, S., C. Durmort, A. Chervin-Petinot, S. Heyraud, M. Dubois, O. Lambert, C. Maillefaud, E. Hewat, J. P. Schaal, P. Huber, and D. Gulino-Debrac. 2010. 'The motor protein myosin-X transports VE-cadherin along filopodia to allow the formation of early endothelial cell-cell contacts', *Mol Cell Biol*, 30: 1703-17.

Anastasiou, D., G. Poulogiannis, J. M. Asara, M. B. Boxer, J. K. Jiang, M. Shen, G. Bellinger, A. T. Sasaki, J. W. Locasale, D. S. Auld, C. J. Thomas, M. G. Vander Heiden, and L. C. Cantley. 2011. 'Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses', *Science*, 334: 1278-83.

Anastasiou, D., Y. Yu, W. J. Israelsen, J. K. Jiang, M. B. Boxer, B. S. Hong, W. Tempel, S. Dimov, M. Shen, A. Jha, H. Yang, K. R. Mattaini, C. M. Metallo, B. P. Fiske, K. D. Courtney, S. Malstrom, T. M. Khan, C. Kung, A. P. Skoumbourdis, H. Veith, N. Southall, M. J. Walsh, K. R. Brimacombe, W. Leister, S. Y. Lunt, Z. R. Johnson, K. E. Yen, K. Kunii, S. M. Davidson, H. R. Christofk, C. P. Austin, J. Inglese, M. H. Harris, J. M. Asara, G. Stephanopoulos, F. G. Salituro, S. Jin, L. Dang, D. S. Auld, H. W. Park, L. C. Cantley, C. J. Thomas, and M. G. Vander Heiden. 2012. 'Pyruvate kinase M2 activators

promote tetramer formation and suppress tumorigenesis', *Nat Chem Biol*, 8: 839-47.

Andersson, U., H. Wang, K. Palmblad, A. C. Aveberger, O. Bloom, H. Erlandsson-Harris, A. Janson, R. Kokkola, M. Zhang, H. Yang, and K. J. Tracey. 2000. 'High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes', *J Exp Med*, 192: 565-70.

Ashizawa, K., M. C. Willingham, C. M. Liang, and S. Y. Cheng. 1991. 'In vivo regulation of monomer-tetramer conversion of pyruvate kinase subtype M2 by glucose is mediated via fructose 1,6-bisphosphate', *J Biol Chem*, 266: 16842-6.

Aydogan, V., A. Lenard, A. S. Denes, L. Sauteur, H. G. Belting, and M. Affolter. 2015. 'Endothelial cell division in angiogenic sprouts of differing cellular architecture', *Biol Open*, 4: 1259-69.

Bacallao, R., A. Garfinkel, S. Monke, G. Zampighi, and L. J. Mandel. 1994. 'ATP depletion: a novel method to study junctional properties in epithelial tissues. I. Rearrangement of the actin cytoskeleton', *J Cell Sci*, 107 (Pt 12): 3301-13.

Baumer, S., L. Keller, A. Holtmann, R. Funke, B. August, A. Gamp, H. Wolburg, K. Wolburg-Buchholz, U. Deutsch, and D. Vestweber. 2006. 'Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development', *Blood*, 107: 4754-62.

Bayless, K. J., and G. A. Johnson. 2011. 'Role of the cytoskeleton in formation and maintenance of angiogenic sprouts', *J Vasc Res*, 48: 369-85.

Bazzoni, G. 2006. 'Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall', *Thromb Haemost*, 95: 36-42.

Bazzoni, G., and E. Dejana. 2004. 'Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis', *Physiol Rev*, 84: 869-901.

- Bazzoni, G., O. M. Martinez-Estrada, F. Orsenigo, M. Cordenonsi, S. Citi, and E. Dejana. 2000. 'Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin', *J Biol Chem*, 275: 20520-6.
- Belvitch, P., and S. M. Dudek. 2012. 'Role of FAK in S1P-regulated endothelial permeability', *Microvasc Res*, 83: 22-30.
- Ben-Ze'ev, A., and B. Geiger. 1998. 'Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer', *Curr Opin Cell Biol*, 10: 629-39.
- Bentley, K., C. A. Franco, A. Philippides, R. Blanco, M. Dierkes, V. Gebala, F. Stanchi, M. Jones, I. M. Aspalter, G. Cagna, S. Westrom, L. Claesson-Welsh, D. Vestweber, and H. Gerhardt. 2014. 'The role of differential VE-cadherin dynamics in cell rearrangement during angiogenesis', *Nat Cell Biol*, 16: 309-21.
- Bershadsky, A. 2004. 'Magic touch: how does cell-cell adhesion trigger actin assembly?', *Trends Cell Biol*, 14: 589-93.
- Birau, A., R. A. Ceausu, A. M. Cimpean, P. Gaje, M. Raica, and T. Olariu. 2012. 'Assesment of angiogenesis reveals blood vessel heterogeneity in lung carcinoma', *Oncol Lett*, 4: 1183-86.
- Birdsey, G. M., A. V. Shah, N. Dufton, L. E. Reynolds, L. Osuna Almagro, Y. Yang, I. M. Aspalter, S. T. Khan, J. C. Mason, E. Dejana, B. Gottgens, K. Hodivala-Dilke, H. Gerhardt, R. H. Adams, and A. M. Randi. 2015. 'The endothelial transcription factor ERG promotes vascular stability and growth through Wnt/beta-catenin signaling', *Dev Cell*, 32: 82-96.
- Birukova, A. A., S. Chatchavalvanich, O. Oskolkova, V. N. Bochkov, and K. G. Birukov. 2007. 'Signaling pathways involved in OxPAPC-induced pulmonary endothelial barrier protection', *Microvasc Res*, 73: 173-81.
- Bloor, C. M. 2005. 'Angiogenesis during exercise and training', *Angiogenesis*, 8: 263-71.

Bluemlein, K., N. M. Gruning, R. G. Feichtinger, H. Lehrach, B. Kofler, and M. Ralser. 2011. 'No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis', *Oncotarget*, 2: 393-400.

Boeckel, J. N., A. Derlet, S. F. Glaser, A. Luczak, T. Lucas, A. W. Heumuller, M. Kruger, C. M. Zehendner, D. Kaluza, A. Doddaballapur, K. Ohtani, K. Treguer, and S. Dimmeler. 2016. 'JMJD8 Regulates Angiogenic Sprouting and Cellular Metabolism by Interacting With Pyruvate Kinase M2 in Endothelial Cells', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36: 1425-33.

Bogatcheva, N. V., and A. D. Verin. 2008. 'The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function', *Microvasc Res*, 76: 202-7.

Bogatcheva, N. V., A. D. Verin, P. Wang, A. A. Birukova, K. G. Birukov, T. Mirzopoyazova, D. M. Adyshev, E. T. Chiang, M. T. Crow, and J. G. Garcia. 2003. 'Phorbol esters increase MLC phosphorylation and actin remodeling in bovine lung endothelium without increased contraction', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285: L415-26.

Boggon, T. J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B. M. Gumbiner, and L. Shapiro. 2002. 'C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms', *Science*, 296: 1308-13.

Bos, J. L. 2005. 'Linking Rap to cell adhesion', *Curr Opin Cell Biol*, 17: 123-8.

Boxer, M. B., J. Jiang, M. G. Vander Heiden, M. Shen, H. Veith, L. C. Cantley, and C. J. Thomas. 2010. 'Identification of activators for the M2 isoform of human pyruvate kinase Version 3.' in, *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program (Bethesda (MD))*.

Braga, V. M. 2002. 'Cell-cell adhesion and signalling', *Curr Opin Cell Biol*, 14: 546-56.

Cain, R. J., and A. J. Ridley. 2009. 'Phosphoinositide 3-kinases in cell migration', *Biol Cell*, 101: 13-29.

Cantelmo, A. R., L. C. Conradi, A. Brajic, J. Goveia, J. Kalucka, A. Pircher, P. Chaturvedi, J. Hol, B. Thienpont, L. A. Teuwen, S. Schoors, B. Boeckx, J. Vriens, A. Kuchnio, K. Veys, B. Cruys, L. Finotto, L. Treps, T. E. Stav-Noraas, F. Bifari, P. Stapor, I. Decimo, K. Kampen, K. De Bock, G. Haraldsen, L. Schoonjans, T. Rabelink, G. Eelen, B. Ghesquiere, J. Rehman, D. Lambrechts, A. B. Malik, M. Dewerchin, and P. Carmeliet. 2016. 'Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy', *Cancer Cell*, 30: 968-85.

Carmeliet, P. 2000. 'Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis', *Nat Med*, 6: 389-95.

Carmeliet, P., and R. K. Jain. 2011. 'Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis', *Nature*, 473: 298-307.

Carmeliet, P., M. G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, R. Spagnuolo, B. Oosthuysse, M. Dewerchin, A. Zanetti, A. Angellilo, V. Mattot, D. Nuyens, E. Lutgens, F. Clotman, M. C. de Ruiter, A. Gittenberger-de Groot, R. Poelmann, F. Lupu, J. M. Herbert, D. Collen, and E. Dejana. 1999. 'Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis', *Cell*, 98: 147-57.

Causeret, M., N. Taulat, F. Comunale, C. Favard, and C. Gauthier-Rouviere. 2005. 'N-cadherin association with lipid rafts regulates its dynamic assembly at cell-cell junctions in C2C12 myoblasts', *Mol Biol Cell*, 16: 2168-80.

Clower, C. V., D. Chatterjee, Z. Wang, L. C. Cantley, M. G. Vander Heiden, and A. R. Krainer. 2010. 'The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 1894-9.

Costa, G., K. I. Harrington, H. E. Lovegrove, D. J. Page, S. Chakravartula, K. Bentley, and S. P. Herbert. 2016. 'Asymmetric division coordinates collective cell migration in angiogenesis', *Nat Cell Biol*, 18: 1292-301.

Coutelle, O., H. T. Hornig-Do, A. Witt, M. Andree, L. M. Schiffmann, M. Piekarek, K. Brinkmann, J. M. Seeger, M. Liwschitz, S. Miwa, M. Hallek, M. Kronke, A. Trifunovic, S. A. Eming, R. J. Wiesner, U. T. Hacker, and H. Kashkar. 2014. 'Embelin inhibits endothelial mitochondrial respiration and impairs neoangiogenesis during tumor growth and wound healing', *EMBO Mol Med*, 6: 624-39.

Cruys, B., B. W. Wong, A. Kuchnio, D. Verdegem, A. R. Cantelmo, L. C. Conradi, S. Vandekeere, A. Bouche, I. Cornelissen, S. Vinckier, R. M. Merks, E. Dejana, H. Gerhardt, M. Dewerchin, K. Bentley, and P. Carmeliet. 2016. 'Glycolytic regulation of cell rearrangement in angiogenesis', *Nat Commun*, 7: 12240.

Chaneton, B., and E. Gottlieb. 2012. 'Rocking cell metabolism: revised functions of the key glycolytic regulator PKM2 in cancer', *Trends Biochem Sci*, 37: 309-16.

Chaneton, B., P. Hillmann, L. Zheng, A. C. Martin, O. D. Maddocks, A. Chokkathukalam, J. E. Coyle, A. Jankevics, F. P. Holding, K. H. Vousden, C. Frezza, M. O'Reilly, and E. Gottlieb. 2012. 'Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2', *Nature*, 491: 458-62.

Chen, J., J. Xie, Z. Jiang, B. Wang, Y. Wang, and X. Hu. 2011. 'Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2', *Oncogene*, 30: 4297-306.

Chen, Y. L., J. J. Song, X. C. Chen, W. Xu, Q. Zhi, Y. P. Liu, H. Z. Xu, J. S. Pan, J. L. Ren, and B. Guleng. 2015. 'Mechanisms of pyruvate kinase M2 isoform inhibits cell motility in hepatocellular carcinoma cells', *World J Gastroenterol*, 21: 9093-102.

Chervin-Petiot, A., M. Courcon, S. Almagro, A. Nicolas, A. Grichine, D. Grunwald, M. H. Prandini, P. Huber, and D. Gulino-Debrac. 2012. 'Epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) interacts with alpha-catenin and actin filaments in endothelial cells and stabilizes vascular capillary network in vitro', *J Biol Chem*, 287: 7556-72.

Christofk, H. R., M. G. Vander Heiden, M. H. Harris, A. Ramanathan, R. E. Gerszten, R. Wei, M. D. Fleming, S. L. Schreiber, and L. C. Cantley. 2008. 'The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth', *Nature*, 452: 230-3.

Christofk, H. R., M. G. Vander Heiden, N. Wu, J. M. Asara, and L. C. Cantley. 2008. 'Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein', *Nature*, 452: 181-6.

Chuang, I. C., C. M. Yang, T. Y. Song, N. C. Yang, and M. L. Hu. 2015. 'The anti-angiogenic action of 2-deoxyglucose involves attenuation of VEGFR2 signaling and MMP-2 expression in HUVECs', *Life Sci*, 139: 52-61.

Dang, C. V. 2013. 'MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3.

Davis, G. E., A. N. Stratman, A. Sacharidou, and W. Koh. 2011. 'Molecular basis for endothelial lumen formation and tubulogenesis during vasculogenesis and angiogenic sprouting', *Int Rev Cell Mol Biol*, 288: 101-65.

Dayton, T. L., V. Gocheva, K. M. Miller, W. J. Israelsen, A. Bhutkar, C. B. Clish, S. M. Davidson, A. Luengo, R. T. Bronson, T. Jacks, and M. G. Vander Heiden. 2016. 'Germline loss of PKM2 promotes metabolic distress and hepatocellular carcinoma', *Genes Dev*, 30: 1020-33.

De Bock, K., M. Georgiadou, S. Schoors, A. Kuchnio, B. W. Wong, A. R. Cantelmo, A. Quaegebeur, B. Ghesquiere, S. Cauwenberghs, G. Eelen, L. K. Phng, I. Betz, B. Tembuysen, K. Brepoels, J. Welte, I. Geudens, I. Segura, B. Cruys, F. Bifari, I. Decimo, R. Blanco, S. Wyns, J. Vangindertael, S. Rocha, R. T. Collins, S. Munck, D. Daelemans, H. Imamura, R. Devlieger, M. Rider, P. P. Van Veldhoven, F. Schuit, R. Bartrons, J. Hofkens, P. Fraisl, S. Telang, R. J. Deberardinis, L. Schoonjans, S. Vinckier, J. Chesney, H. Gerhardt, M. Dewerchin, and P. Carmeliet. 2013. 'Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting', *Cell*, 154: 651-63.

- DeBerardinis, R. J., and T. Cheng. 2010. 'Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer', *Oncogene*, 29: 313-24.
- Dejana, E. 2004. 'Endothelial cell-cell junctions: happy together', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 261-70.
- Dejana, E., and M. G. Lampugnani. 2014. 'Differential adhesion drives angiogenesis', *Nat Cell Biol*, 16: 305-6.
- Dejana, E., F. Orsenigo, and M. G. Lampugnani. 2008. 'The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability', *J Cell Sci*, 121: 2115-22.
- Dejana, E., E. Tournier-Lasserre, and B. M. Weinstein. 2009. 'The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications', *Dev Cell*, 16: 209-21.
- Delgado-Bellido, D., S. Serrano-Saenz, M. Fernandez-Cortes, and F. J. Oliver. 2017. 'Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin', *Mol Cancer*, 16: 65.
- Detry, B., F. Bruyere, C. Erpicum, J. Paupert, F. Lamaye, C. Maillard, B. Lenoir, J. M. Foidart, M. Thiry, and A. Noel. 2011. 'Digging deeper into lymphatic vessel formation in vitro and in vivo', *BMC Cell Biol*, 12: 29.
- Doddaballapur, A., K. M. Michalik, Y. Manavski, T. Lucas, R. H. Houtkooper, X. You, W. Chen, A. M. Zeiher, M. Potente, S. Dimmeler, and R. A. Boon. 2015. 'Laminar shear stress inhibits endothelial cell metabolism via KLF2-mediated repression of PFKFB3', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35: 137-45.
- Dombrackas, J. D., B. D. Santarsiero, and A. D. Mesecar. 2005. 'Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis', *Biochemistry*, 44: 9417-29.
- Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W. J. Nelson, and W. I. Weis. 2005. 'Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly', *Cell*, 123: 903-15.

- Dudek, S. M., and J. G. Garcia. 2001. 'Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability', *J Appl Physiol* (1985), 91: 1487-500.
- Dudek, S. M., J. R. Jacobson, E. T. Chiang, K. G. Birukov, P. Wang, X. Zhan, and J. G. Garcia. 2004. 'Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by sphingosine 1-phosphate: roles for cortactin and myosin light chain kinase', *J Biol Chem*, 279: 24692-700.
- Eelen, G., P. de Zeeuw, M. Simons, and P. Carmeliet. 2015. 'Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature', *Circ Res*, 116: 1231-44.
- Eijkelenboom, A., and B. M. Burgering. 2013. 'FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 83-97.
- Fanning, A. S., B. J. Jameson, L. A. Jesaitis, and J. M. Anderson. 1998. 'The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton', *J Biol Chem*, 273: 29745-53.
- Fantin, A., A. Lampropoulou, G. Gestri, C. Raimondi, V. Senatore, I. Zachary, and C. Ruhrberg. 2015. 'NRP1 Regulates CDC42 Activation to Promote Filopodia Formation in Endothelial Tip Cells', *Cell Rep*, 11: 1577-90.
- Fernandez-Martin, L., B. Marcos-Ramiro, C. L. Bigarella, M. Graupera, R. J. Cain, N. Reglero-Real, A. Jimenez, E. Cernuda-Morollon, I. Correas, S. Cox, A. J. Ridley, and J. Millan. 2012. 'Crosstalk between reticular adherens junctions and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 regulates endothelial barrier function', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32: e90-102.
- Fraccaroli, A., B. Pitter, A. A. Taha, J. Seebach, S. Huvneers, J. Kirsch, R. P. Casaroli-Marano, S. Zahler, U. Pohl, H. Gerhardt, H. J. Schnittler, and E. Montanez. 2015. 'Endothelial alpha-parvin controls integrity of developing vasculature and is required for maintenance of cell-cell junctions', *Circ Res*, 117: 29-40.
- Frank, M., and R. Kemler. 2002. 'Protocadherins', *Curr Opin Cell Biol*, 14: 557-62.

Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1993. 'Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions', *J Cell Biol*, 123: 1777-88.

Gacche, R. N. 2015. 'Compensatory angiogenesis and tumor refractoriness', *Oncogenesis*, 4: e153.

Gaengel, K., G. Genove, A. Armulik, and C. Betsholtz. 2009. 'Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29: 630-8.

Gaengel, K., C. Niaudet, K. Hagikura, B. Lavina, L. Muhl, J. J. Hofmann, L. Ebarasi, S. Nystrom, S. Rymo, L. L. Chen, M. F. Pang, Y. Jin, E. Raschperger, P. Roswall, D. Schulte, R. Benedito, J. Larsson, M. Hellstrom, J. Fuxe, P. Uhlen, R. Adams, L. Jakobsson, A. Majumdar, D. Vestweber, A. Uv, and C. Betsholtz. 2012. 'The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2', *Dev Cell*, 23: 587-99.

Gao, X., and J. Zhang. 2009. 'Akt signaling dynamics in plasma membrane microdomains visualized by FRET-based reporters', *Commun Integr Biol*, 2: 32-4.

Gavard, J., and J. S. Gutkind. 2008. 'Protein kinase C-related kinase and ROCK are required for thrombin-induced endothelial cell permeability downstream from Galpha12/13 and Galpha11/q', *J Biol Chem*, 283: 29888-96.

Gavard, J., V. Patel, and J. S. Gutkind. 2008. 'Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia', *Dev Cell*, 14: 25-36.

Genova, T., G. P. Grolez, C. Camillo, M. Bernardini, A. Bokhobza, E. Richard, M. Scianna, L. Lemonnier, D. Valdembri, L. Munaron, M. R. Philips, V. Mattot, G. Serini, N. Prevarskaya, D. Gkika, and A. F. Pla. 2017. 'TRPM8 inhibits endothelial cell migration via a non-channel function by trapping the small GTPase Rap1', *J Cell Biol*, 216: 2107-30.

Gentil-dit-Maurin, A., S. Oun, S. Almagro, S. Bouillot, M. Courcon, R. Linnepe, D. Vestweber, P. Huber, and E. Tillet. 2010. 'Unraveling the distinct distributions of VE- and N-cadherins in endothelial cells: a key role for p120-catenin', *Exp Cell Res*, 316: 2587-99.

Gerhardt, H., M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima, and C. Betsholtz. 2003. 'VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia', *J Cell Biol*, 161: 1163-77.

Ghesquiere, B., B. W. Wong, A. Kuchnio, and P. Carmeliet. 2014. 'Metabolism of stromal and immune cells in health and disease', *Nature*, 511: 167-76.

Gloerich, M., J. M. Bianchini, K. A. Siemers, D. J. Cohen, and W. J. Nelson. 2017. 'Cell division orientation is coupled to cell-cell adhesion by the E-cadherin/LGN complex', *Nat Commun*, 8: 13996.

Goldberg, M. S., and P. A. Sharp. 2012. 'Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression', *J Exp Med*, 209: 217-24.

Gonzalez, A. M., B. F. Cyrus, and W. A. Muller. 2016. 'Targeted Recycling of the Lateral Border Recycling Compartment Precedes Adherens Junction Dissociation during Transendothelial Migration', *Am J Pathol*, 186: 1387-402.

Gordon, E. J., D. Fukuhara, S. Westrom, N. Padhan, E. O. Sjostrom, L. van Meeteren, L. He, F. Orsenigo, E. Dejana, K. Bentley, A. Spurkland, and L. Claesson-Welsh. 2016. 'The endothelial adaptor molecule TSA1 is required for VEGF-induced angiogenic sprouting through junctional c-Src activation', *Sci Signal*, 9: ra72.

Gory-Faure, S., M. H. Prandini, H. Pointu, V. Rouillot, I. Pignot-Paintrand, M. Vernet, and P. Huber. 1999. 'Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis', *Development*, 126: 2093-102.

Gui, D. Y., C. A. Lewis, and M. G. Vander Heiden. 2013. 'Allosteric regulation of PKM2 allows cellular adaptation to different physiological states', *Sci Signal*, 6: pe7.

Hatsell, S., and P. Cowin. 2001. 'Deconstructing desmoplakin', *Nat Cell Biol*, 3: E270-2.

Hayer, A., L. Shao, M. Chung, L. M. Joubert, H. W. Yang, F. C. Tsai, A. Bisaria, E. Betzig, and T. Meyer. 2016. 'Engulfed cadherin fingers are polarized junctional structures between collectively migrating endothelial cells', *Nat Cell Biol*, 18: 1311-23.

Hebda, J. K., H. M. Leclair, S. Azzi, C. Roussel, M. G. Scott, N. Bidere, and J. Gavard. 2013. 'The C-terminus region of beta-arrestin1 modulates VE-cadherin expression and endothelial cell permeability', *Cell Commun Signal*, 11: 37.

Hellstrom, M., L. K. Phng, and H. Gerhardt. 2007. 'VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting', *Cell Adh Migr*, 1: 133-6.

Hellstrom, M., L. K. Phng, J. J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, J. Alva, A. K. Nilsson, L. Karlsson, N. Gaiano, K. Yoon, J. Rossant, M. L. Iruela-Arispe, M. Kalen, H. Gerhardt, and C. Betsholtz. 2007. 'Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis', *Nature*, 445: 776-80.

Herbert, S. P., and D. Y. Stainier. 2011. 'Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12: 551-64.

Herren, B., B. Levkau, E. W. Raines, and R. Ross. 1998. 'Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases', *Mol Biol Cell*, 9: 1589-601.

Herrenknecht, K., M. Ozawa, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, M. Lenter, and R. Kemler. 1991. 'The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 9156-60.

Herrero-Mendez, A., A. Almeida, E. Fernandez, C. Maestre, S. Moncada, and J. P. Bolanos. 2009. 'The bioenergetic and antioxidant status of neurons is

controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1', *Nat Cell Biol*, 11: 747-52.

Hillen, F., and A. W. Griffioen. 2007. 'Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond', *Cancer Metastasis Rev*, 26: 489-502.

Hitosugi, T., S. Kang, M. G. Vander Heiden, T. W. Chung, S. Elf, K. Lythgoe, S. Dong, S. Lonial, X. Wang, G. Z. Chen, J. Xie, T. L. Gu, R. D. Polakiewicz, J. L. Roesel, T. J. Boggon, F. R. Khuri, D. G. Gilliland, L. C. Cantley, J. Kaufman, and J. Chen. 2009. 'Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth', *Sci Signal*, 2: ra73.

Hoang, M. V., J. A. Nagy, and D. R. Senger. 2011. 'Cdc42-mediated inhibition of GSK-3beta improves angio-architecture and lumen formation during VEGF-driven pathological angiogenesis', *Microvasc Res*, 81: 34-43.

Hoelzle, M. K., and T. Svitkina. 2012. 'The cytoskeletal mechanisms of cell-cell junction formation in endothelial cells', *Mol Biol Cell*, 23: 310-23.

Hosios, A. M., B. P. Fiske, D. Y. Gui, and M. G. Vander Heiden. 2015. 'Lack of Evidence for PKM2 Protein Kinase Activity', *Mol Cell*, 59: 850-7.

Hu, G. H., H. Liu, P. Lai, Z. F. Guo, L. Xu, X. D. Yao, J. H. Zheng, M. Liu, and Y. F. Xu. 2014. 'Delta-like ligand 4 (Dll4) predicts the prognosis of clear cell renal cell carcinoma, and anti-Dll4 suppresses tumor growth in vivo', *Int J Clin Exp Pathol*, 7: 2143-52.

Hu, H., A. Juvekar, C. A. Lyssiotis, E. C. Lien, J. G. Albeck, D. Oh, G. Varma, Y. P. Hung, S. Ullas, J. Loring, P. Seth, M. R. Lundquist, D. R. Tolan, A. K. Grant, D. J. Needleman, J. M. Asara, L. C. Cantley, and G. M. Wulf. 2016. 'Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Glycolysis through Mobilization of Aldolase from the Actin Cytoskeleton', *Cell*, 164: 433-46.

Huang, B. X., M. Akbar, K. Kevala, and H. Y. Kim. 2011. 'Phosphatidylserine is a critical modulator for Akt activation', *J Cell Biol*, 192: 979-92.

Huber, A. H., and W. I. Weis. 2001. 'The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin', *Cell*, 105: 391-402.

Hudry-Clergeon, H., D. Stengel, E. Ninio, and I. Vilgrain. 2005. 'Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase', *FASEB J*, 19: 512-20.

Huveneers, S., J. Oldenburg, E. Spanjaard, G. van der Krogt, I. Grigoriev, A. Akhmanova, H. Rehmann, and J. de Rooij. 2012. 'Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling', *J Cell Biol*, 196: 641-52.

Israelsen, W. J., T. L. Dayton, S. M. Davidson, B. P. Fiske, A. M. Hosios, G. Bellinger, J. Li, Y. Yu, M. Sasaki, J. W. Horner, L. N. Burga, J. Xie, M. J. Jurczak, R. A. DePinho, C. B. Clish, T. Jacks, R. G. Kibbey, G. M. Wulf, D. Di Vizio, G. B. Mills, L. C. Cantley, and M. G. Vander Heiden. 2013. 'PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells', *Cell*, 155: 397-409.

Israelsen, W. J., and M. G. Vander Heiden. 2015. 'Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer', *Semin Cell Dev Biol*, 43: 43-51.

Jacobson, J. R., and J. G. Garcia. 2007. 'Novel therapies for microvascular permeability in sepsis', *Curr Drug Targets*, 8: 509-14.

Jain, R. K. 2003. 'Molecular regulation of vessel maturation', *Nat Med*, 9: 685-93.

Jakobsson, L., C. A. Franco, K. Bentley, R. T. Collins, B. Ponsioen, I. M. Aspalter, I. Rosewell, M. Busse, G. Thurston, A. Medvinsky, S. Schulte-Merker, and H. Gerhardt. 2010. 'Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting', *Nat Cell Biol*, 12: 943-53.

Jiang, J. K., M. B. Boxer, M. G. Vander Heiden, M. Shen, A. P. Skoumbourdis, N. Southall, H. Veith, W. Leister, C. P. Austin, H. W. Park, J. Inglese, L. C.

Cantley, D. S. Auld, and C. J. Thomas. 2010. 'Evaluation of thieno[3,2-b]pyrrole[3,2-d]pyridazinones as activators of the tumor cell specific M2 isoform of pyruvate kinase', *Bioorg Med Chem Lett*, 20: 3387-93.

Jiang, Y., X. Li, W. Yang, D. H. Hawke, Y. Zheng, Y. Xia, K. Aldape, C. Wei, F. Guo, Y. Chen, and Z. Lu. 2014. 'PKM2 regulates chromosome segregation and mitosis progression of tumor cells', *Mol Cell*, 53: 75-87.

Jones, D. P. 1986. 'Intracellular diffusion gradients of O₂ and ATP', *Am J Physiol*, 250: C663-75.

Joseph, R., O. P. Srivastava, and R. R. Pfister. 2014. 'Downregulation of beta-actin and its regulatory gene HuR affect cell migration of human corneal fibroblasts', *Mol Vis*, 20: 593-605.

Jurica, M. S., A. Mesecar, P. J. Heath, W. Shi, T. Nowak, and B. L. Stoddard. 1998. 'The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate', *Structure*, 6: 195-210.

Kalaiarasan, P., N. Subbarao, and R. N. Bamezai. 2014. 'Molecular simulation of Tyr105 phosphorylated pyruvate kinase M2 to understand its structure and dynamics', *J Mol Model*, 20: 2447.

Keller, K. E., I. S. Tan, and Y. S. Lee. 2012. 'SAICAR stimulates pyruvate kinase isoform M2 and promotes cancer cell survival in glucose-limited conditions', *Science*, 338: 1069-72.

Knudsen, K. A., A. P. Soler, K. R. Johnson, and M. J. Wheelock. 1995. 'Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin', *J Cell Biol*, 130: 67-77.

Konerding, M. A., A. Turhan, D. J. Ravnicek, M. Lin, C. Fuchs, T. W. Secomb, A. Tsuda, and S. J. Mentzer. 2010. 'Inflammation-induced intussusceptive angiogenesis in murine colitis', *Anat Rec (Hoboken)*, 293: 849-57.

Kooistra, M. R., N. Dube, and J. L. Bos. 2007. 'Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation', *J Cell Sci*, 120: 17-22.

Koudelkova, P., G. Weber, and W. Mikulits. 2015. 'Liver Sinusoidal Endothelial Cells Escape Senescence by Loss of p19ARF', *PLoS One*, 10: e0142134.

Kouklis, P., M. Konstantoulaki, and A. B. Malik. 2003. 'VE-cadherin-induced Cdc42 signaling regulates formation of membrane protrusions in endothelial cells', *J Biol Chem*, 278: 16230-6.

Kowalczyk, A. P., and B. A. Nanes. 2012. 'Adherens junction turnover: regulating adhesion through cadherin endocytosis, degradation, and recycling', *Subcell Biochem*, 60: 197-222.

Kronstein, R., J. Seebach, S. Grossklaus, C. Minten, B. Engelhardt, M. Drab, S. Liebner, Y. Arsenijevic, A. A. Taha, T. Afanasieva, and H. J. Schnittler. 2012. 'Caveolin-1 opens endothelial cell junctions by targeting catenins', *Cardiovasc Res*, 93: 130-40.

Kumar, Y., K. Gurusamy, V. Pamecha, and B. R. Davidson. 2007. 'Tumor M2-pyruvate kinase as tumor marker in exocrine pancreatic cancer a meta-analysis', *Pancreas*, 35: 114-9.

Lambert, M., D. Choquet, and R. M. Mege. 2002. 'Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton', *J Cell Biol*, 157: 469-79.

Lammert, E., and J. Axnick. 2012. 'Vascular lumen formation', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a006619.

Lampugnani, M. G. 2012. 'Endothelial cell-to-cell junctions: adhesion and signaling in physiology and pathology', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.

Lampugnani, M. G., and E. Dejana. 2007. 'Adherens junctions in endothelial cells regulate vessel maintenance and angiogenesis', *Thromb Res*, 120 Suppl 2: S1-6.

Lampugnani, M. G., F. Orsenigo, M. C. Gagliani, C. Tacchetti, and E. Dejana. 2006. 'Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments', *J Cell Biol*, 174: 593-604.

- Lampugnani, M. G., M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L. P. Ruco, and E. Dejana. 1992. 'A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts', *J Cell Biol*, 118: 1511-22.
- Larsen, T. M., M. M. Benning, I. Rayment, and G. H. Reed. 1998. 'Structure of the bis(Mg²⁺)-ATP-oxalate complex of the rabbit muscle pyruvate kinase at 2.1 Å resolution: ATP binding over a barrel', *Biochemistry*, 37: 6247-55.
- Le Borgne, R., Y. Bellaïche, and F. Schweisguth. 2002. 'Drosophila E-cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage', *Curr Biol*, 12: 95-104.
- Lee, J. S., and A. I. Gotlieb. 2002. 'Microtubule-actin interactions may regulate endothelial integrity and repair', *Cardiovasc Pathol*, 11: 135-40.
- . 2003. 'Understanding the role of the cytoskeleton in the complex regulation of the endothelial repair', *Histol Histopathol*, 18: 879-87.
- Lee, O. H., Y. M. Kim, Y. M. Lee, E. J. Moon, D. J. Lee, J. H. Kim, K. W. Kim, and Y. G. Kwon. 1999. 'Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 264: 743-50.
- Lenard, A., E. Ellertsdottir, L. Herwig, A. Krudewig, L. Sauter, H. G. Belting, and M. Affolter. 2013. 'In vivo analysis reveals a highly stereotypic morphogenetic pathway of vascular anastomosis', *Dev Cell*, 25: 492-506.
- Li, W., J. Liu, K. Jackson, R. Shi, and Y. Zhao. 2014. 'Sensitizing the therapeutic efficacy of taxol with shikonin in human breast cancer cells', *PLoS One*, 9: e94079.
- Li, X., Y. Jiang, J. Meisenhelder, W. Yang, D. H. Hawke, Y. Zheng, Y. Xia, K. Aldape, J. He, T. Hunter, L. Wang, and Z. Lu. 2016. 'Mitochondria-Translocated PGK1 Functions as a Protein Kinase to Coordinate Glycolysis and the TCA Cycle in Tumorigenesis', *Mol Cell*, 61: 705-19.

Li, X., N. Padhan, E. O. Sjostrom, F. P. Roche, C. Testini, N. Honkura, M. Sainz-Jaspeado, E. Gordon, K. Bentley, A. Philippides, V. Tolmachev, E. Dejana, R. V. Stan, D. Vestweber, K. Ballmer-Hofer, C. Betsholtz, K. Pietras, L. Jansson, and L. Claesson-Welsh. 2016. 'VEGFR2 pY949 signalling regulates adherens junction integrity and metastatic spread', *Nat Commun*, 7: 11017.

Liang, J., R. Cao, X. Wang, Y. Zhang, P. Wang, H. Gao, C. Li, F. Yang, R. Zeng, P. Wei, D. Li, W. Li, and W. Yang. 2017. 'Mitochondrial PKM2 regulates oxidative stress-induced apoptosis by stabilizing Bcl2', *Cell Res*, 27: 329-51.

Liao, S., and P. Y. von der Weid. 2015. 'Lymphatic system: an active pathway for immune protection', *Semin Cell Dev Biol*, 38: 83-9.

Lilien, J., and J. Balsamo. 2005. 'The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin', *Curr Opin Cell Biol*, 17: 459-65.

Lim, M. J., E. T. Chiang, H. B. Hechtman, and D. Shepro. 2001. 'Inflammation-induced subcellular redistribution of VE-cadherin, actin, and gamma-catenin in cultured human lung microvessel endothelial cells', *Microvasc Res*, 62: 366-82.

Liu, Z., J. L. Tan, D. M. Cohen, M. T. Yang, N. J. Sniadecki, S. A. Ruiz, C. M. Nelson, and C. S. Chen. 2010. 'Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 9944-9.

Logsdon, E. A., S. D. Finley, A. S. Popel, and F. Mac Gabhann. 2014. 'A systems biology view of blood vessel growth and remodelling', *J Cell Mol Med*, 18: 1491-508.

Lopaschuk, G. D., J. R. Ussher, C. D. Folmes, J. S. Jaswal, and W. C. Stanley. 2010. 'Myocardial fatty acid metabolism in health and disease', *Physiol Rev*, 90: 207-58.

Lunt, S. Y., V. Muralidhar, A. M. Hosios, W. J. Israelsen, D. Y. Gui, L. Newhouse, M. Ogrodzinski, V. Hecht, K. Xu, P. N. Acevedo, D. P. Hollern, G. Bellinger, T. L. Dayton, S. Christen, I. Elia, A. T. Dinh, G. Stephanopoulos, S. R. Manalis, M. B. Yaffe, E. R. Andrechek, S. M. Fendt, and M. G. Vander

Heiden. 2015. 'Pyruvate kinase isoform expression alters nucleotide synthesis to impact cell proliferation', *Mol Cell*, 57: 95-107.

Luplertlop, N., D. Misse, D. Bray, V. Deleuze, J. P. Gonzalez, V. Leardkamolkarn, H. Yssel, and F. Veas. 2006. 'Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction', *EMBO Rep*, 7: 1176-81.

Lv, L., D. Li, D. Zhao, R. Lin, Y. Chu, H. Zhang, Z. Zha, Y. Liu, Z. Li, Y. Xu, G. Wang, Y. Huang, Y. Xiong, K. L. Guan, and Q. Y. Lei. 2011. 'Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth', *Mol Cell*, 42: 719-30.

Lv, L., Y. P. Xu, D. Zhao, F. L. Li, W. Wang, N. Sasaki, Y. Jiang, X. Zhou, T. T. Li, K. L. Guan, Q. Y. Lei, and Y. Xiong. 2013. 'Mitogenic and oncogenic stimulation of K433 acetylation promotes PKM2 protein kinase activity and nuclear localization', *Mol Cell*, 52: 340-52.

Maeda, T., M. Inagaki, Y. Fujita, T. Kimoto, C. Tanabe-Fujimura, K. Zou, J. Liu, S. Liu, and H. Komano. 2016. 'ATP increases the migration of microglia across the brain endothelial cell monolayer', *Biosci Rep*, 36.

Maes, H., A. Kuchnio, A. Peric, S. Moens, K. Nys, K. De Bock, A. Quaegebeur, S. Schoors, M. Georgiadou, J. Wouters, S. Vinckier, H. Vankelecom, M. Garmyn, A. C. Vion, F. Radtke, C. Boulanger, H. Gerhardt, E. Dejana, M. Dewerchin, B. Ghesquiere, W. Annaert, P. Agostinis, and P. Carmeliet. 2014. 'Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy', *Cancer Cell*, 26: 190-206.

Magrini, E., A. Villa, F. Angiolini, A. Doni, G. Mazzarol, N. Rudini, L. Maddaluno, M. Komuta, B. Topal, H. Prenen, M. Schachner, S. Confalonieri, E. Dejana, F. Bianchi, M. Mazzone, and U. Cavallaro. 2014. 'Endothelial deficiency of L1 reduces tumor angiogenesis and promotes vessel normalization', *J Clin Invest*, 124: 4335-50.

- Marcos-Ramiro, B., D. Garcia-Weber, S. Barroso, J. Feito, M. C. Ortega, E. Cernuda-Morollon, N. Reglero-Real, L. Fernandez-Martin, M. C. Duran, M. A. Alonso, I. Correas, S. Cox, A. J. Ridley, and J. Millan. 2016. 'RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border', *J Cell Biol*, 213: 385-402.
- March, S., E. E. Hui, G. H. Underhill, S. Khetani, and S. N. Bhatia. 2009. 'Microenvironmental regulation of the sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro', *Hepatology*, 50: 920-8.
- Mattila, P. K., and P. Lappalainen. 2008. 'Filopodia: molecular architecture and cellular functions', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 446-54.
- Mazurek, S. 2011. 'Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells', *Int J Biochem Cell Biol*, 43: 969-80.
- Mazurek, S., W. Zwerschke, P. Jansen-Durr, and E. Eigenbrodt. 2001. 'Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex', *Biochem J*, 356: 247-56.
- McClenahan, D., K. Hillenbrand, A. Kapur, D. Carlton, and C. Czuprynski. 2009. 'Effects of extracellular ATP on bovine lung endothelial and epithelial cell monolayer morphologies, apoptoses, and permeabilities', *Clin Vaccine Immunol*, 16: 43-8.
- Mege, R. M., J. Gavard, and M. Lambert. 2006. 'Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton', *Curr Opin Cell Biol*, 18: 541-8.
- Mehta, D., and A. B. Malik. 2006. 'Signaling mechanisms regulating endothelial permeability', *Physiol Rev*, 86: 279-367.
- Menard, L., D. Maughan, and J. Vigoreaux. 2014. 'The structural and functional coordination of glycolytic enzymes in muscle: evidence of a metabolon?', *Biology (Basel)*, 3: 623-44.

- Mentzer, S. J., and M. A. Konerding. 2014. 'Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks', *Angiogenesis*, 17: 499-509.
- Merchan, J. R., K. Kovacs, J. W. Railsback, M. Kurtoglu, Y. Jing, Y. Pina, N. Gao, T. G. Murray, M. A. Lehrman, and T. J. Lampidis. 2010. 'Antiangiogenic activity of 2-deoxy-D-glucose', *PLoS One*, 5: e13699.
- Millan, J., R. J. Cain, N. Reglero-Real, C. Bigarella, B. Marcos-Ramiro, L. Fernandez-Martin, I. Correas, and A. J. Ridley. 2010. 'Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells', *BMC Biol*, 8: 11.
- Millarte, V., and H. Farhan. 2012. 'The Golgi in cell migration: regulation by signal transduction and its implications for cancer cell metastasis', *ScientificWorldJournal*, 2012: 498278.
- Miravet, S., J. Piedra, F. Miro, E. Itarte, A. Garcia de Herreros, and M. Dunach. 2002. 'The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin', *J Biol Chem*, 277: 1884-91.
- Monahan-Earley, R., A. M. Dvorak, and W. C. Aird. 2013. 'Evolutionary origins of the blood vascular system and endothelium', *J Thromb Haemost*, 11 Suppl 1: 46-66.
- Montero-Balaguer, M., K. Swirsding, F. Orsenigo, F. Cotelli, M. Mione, and E. Dejana. 2009. 'Stable vascular connections and remodeling require full expression of VE-cadherin in zebrafish embryos', *PLoS One*, 4: e5772.
- Moreno, V., P. Gonzalo, J. Gomez-Escudero, A. Pollan, R. Acin-Perez, M. Breckenridge, M. Yanez-Mo, O. Barreiro, F. Orsenigo, K. Kadomatsu, C. S. Chen, J. A. Enriquez, E. Dejana, F. Sanchez-Madrid, and A. G. Arroyo. 2014. 'An EMMPRIN-gamma-catenin-Nm23 complex drives ATP production and actomyosin contractility at endothelial junctions', *J Cell Sci*, 127: 3768-81.
- Morgan, H. P., F. J. O'Reilly, M. A. Wear, J. R. O'Neill, L. A. Fothergill-Gilmore, T. Hupp, and M. D. Walkinshaw. 2013. 'M2 pyruvate kinase provides

a mechanism for nutrient sensing and regulation of cell proliferation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 5881-6.

Morita, K., Y. Miyachi, and M. Furuse. 2011. 'Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization', *Eur J Dermatol*, 21: 12-7.

Moy, A. B., K. Blackwell, N. Wang, K. Haxhinasto, M. K. Kasiske, J. Bodmer, G. Reyes, and A. English. 2004. 'Phorbol ester-mediated pulmonary artery endothelial barrier dysfunction through regulation of actin cytoskeletal mechanics', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287: L153-67.

Muirhead, H., D. A. Clayden, D. Barford, C. G. Lorimer, L. A. Fothergill-Gilmore, E. Schiltz, and W. Schmitt. 1986. 'The structure of cat muscle pyruvate kinase', *EMBO J*, 5: 475-81.

Murakami, M., L. T. Nguyen, Z. W. Zhuang, K. L. Moodie, P. Carmeliet, R. V. Stan, and M. Simons. 2008. 'The FGF system has a key role in regulating vascular integrity', *J Clin Invest*, 118: 3355-66.

Nakano, M., H. Imamura, T. Nagai, and H. Noji. 2011. 'Ca²⁺ regulation of mitochondrial ATP synthesis visualized at the single cell level', *ACS Chem Biol*, 6: 709-15.

Nakatsu, M. N., R. C. Sainson, S. Perez-del-Pulgar, J. N. Aoto, M. Aitkenhead, K. L. Taylor, P. M. Carpenter, and C. C. Hughes. 2003. 'VEGF(121) and VEGF(165) regulate blood vessel diameter through vascular endothelial growth factor receptor 2 in an in vitro angiogenesis model', *Lab Invest*, 83: 1873-85.

Nasdala, I., K. Wolburg-Buchholz, H. Wolburg, A. Kuhn, K. Ebnet, G. Brachtendorf, U. Samulowitz, B. Kuster, B. Engelhardt, D. Vestweber, and S. Butz. 2002. 'A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets', *J Biol Chem*, 277: 16294-303.

Navarro, P., L. Ruco, and E. Dejana. 1998. 'Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization', *J Cell Biol*, 140: 1475-84.

Nieset, J. E., A. R. Redfield, F. Jin, K. A. Knudsen, K. R. Johnson, and M. J. Wheelock. 1997. 'Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin', *J Cell Sci*, 110 (Pt 8): 1013-22.

Niessen, C. M., and C. J. Gottardi. 2008. 'Molecular components of the adherens junction', *Biochim Biophys Acta*, 1778: 562-71.

Noguchi, T., H. Inoue, and T. Tanaka. 1986. 'The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing', *J Biol Chem*, 261: 13807-12.

Norris, V., P. Amar, G. Legent, C. Ripoll, M. Thellier, and J. Ovadi. 2013. 'Sensor potency of the moonlighting enzyme-decorated cytoskeleton: the cytoskeleton as a metabolic sensor', *BMC Biochem*, 14: 3.

Oellerich, M. F., and M. Potente. 2012. 'FOXOs and sirtuins in vascular growth, maintenance, and aging', *Circ Res*, 110: 1238-51.

Onodera, Y., J. M. Nam, and M. J. Bissell. 2014. 'Increased sugar uptake promotes oncogenesis via EPAC/RAP1 and O-GlcNAc pathways', *J Clin Invest*, 124: 367-84.

Orsenigo, F., C. Giampietro, A. Ferrari, M. Corada, A. Galaup, S. Sigismund, G. Ristagno, L. Maddaluno, G. Y. Koh, D. Franco, V. Kurtcuoglu, D. Poulidakos, P. Baluk, D. McDonald, M. Grazia Lampugnani, and E. Dejana. 2012. 'Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo', *Nat Commun*, 3: 1208.

Paik, J. H., R. Kollipara, G. Chu, H. Ji, Y. Xiao, Z. Ding, L. Miao, Z. Tothova, J. W. Horner, D. R. Carrasco, S. Jiang, D. G. Gilliland, L. Chin, W. H. Wong, D. H. Castrillon, and R. A. DePinho. 2007. 'FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis', *Cell*, 128: 309-23.

Palsson-McDermott, E. M., A. M. Curtis, G. Goel, M. A. Lauterbach, F. J. Sheedy, L. E. Gleeson, M. W. van den Bosch, S. R. Quinn, R. Domingo-

- Fernandez, D. G. Johnston, J. K. Jiang, W. J. Israelsen, J. Keane, C. Thomas, C. Clish, M. Vander Heiden, R. J. Xavier, and L. A. O'Neill. 2015. 'Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1alpha activity and IL-1beta induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages', *Cell Metab*, 21: 65-80.
- Pannekoek, W. J., A. Post, and J. L. Bos. 2014. 'Rap1 signaling in endothelial barrier control', *Cell Adh Migr*, 8: 100-7.
- Patel, S. D., C. P. Chen, F. Bahna, B. Honig, and L. Shapiro. 2003. 'Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family', *Curr Opin Struct Biol*, 13: 690-8.
- Patterson, C. E., and H. Lum. 2001. 'Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function', *Endothelium*, 8: 75-105.
- Pelton, J. C., C. E. Wright, M. Leitges, and V. L. Bautch. 2014. 'Multiple endothelial cells constitute the tip of developing blood vessels and polarize to promote lumen formation', *Development*, 141: 4121-6.
- Phillips, P. G., H. Lum, A. B. Malik, and M. F. Tsan. 1989. 'Phalloidin prevents thrombin-induced increases in endothelial permeability to albumin', *Am J Physiol*, 257: C562-7.
- Phng, L. K., F. Stanchi, and H. Gerhardt. 2013. 'Filopodia are dispensable for endothelial tip cell guidance', *Development*, 140: 4031-40.
- Pinho, A. V., A. Mawson, A. Gill, M. Arshi, M. Warmerdam, M. Giry-Laterriere, N. Eling, T. Lie, E. Kuster, S. Camargo, A. V. Biankin, J. Wu, and I. Rooman. 2016. 'Sirtuin 1 stimulates the proliferation and the expression of glycolysis genes in pancreatic neoplastic lesions', *Oncotarget*, 7: 74768-78.
- Polet, F., and O. Feron. 2013. 'Endothelial cell metabolism and tumour angiogenesis: glucose and glutamine as essential fuels and lactate as the driving force', *J Intern Med*, 273: 156-65.

Postma, P. W., and J. W. Lengeler. 1985. 'Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system of bacteria', *Microbiol Rev*, 49: 232-69.

Potente, M., L. Ghaeni, D. Baldessari, R. Mostoslavsky, L. Rossig, F. Dequiedt, J. Haendeler, M. Mione, E. Dejana, F. W. Alt, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2007. 'SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth', *Genes Dev*, 21: 2644-58.

Prasain, N., and T. Stevens. 2009. 'The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes', *Microvasc Res*, 77: 53-63.

Puchulu-Campanella, E., H. Chu, D. J. Anstee, J. A. Galan, W. A. Tao, and P. S. Low. 2013. 'Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane', *J Biol Chem*, 288: 848-58.

Qi, W., H. A. Keenan, Q. Li, A. Ishikado, A. Kannt, T. Sadowski, M. A. Yorek, I. H. Wu, S. Lockhart, L. J. Coppey, A. Pfenninger, C. W. Liew, G. Qiang, A. M. Burkart, S. Hastings, D. Pober, C. Cahill, M. A. Niewczasz, W. J. Israelsen, L. Tinsley, I. E. Stillman, P. S. Amenta, E. P. Feener, M. G. Vander Heiden, R. C. Stanton, and G. L. King. 2017. 'Pyruvate kinase M2 activation may protect against the progression of diabetic glomerular pathology and mitochondrial dysfunction', *Nat Med*, 23: 753-62.

Qutub, A. A., and A. S. Popel. 2009. 'Elongation, proliferation & migration differentiate endothelial cell phenotypes and determine capillary sprouting', *BMC Syst Biol*, 3: 13.

Real-Hohn, A., P. Zancan, D. Da Silva, E. R. Martins, L. T. Salgado, C. S. Mermelstein, A. M. Gomes, and M. Sola-Penna. 2010. 'Filamentous actin and its associated binding proteins are the stimulatory site for 6-phosphofructo-1-kinase association within the membrane of human erythrocytes', *Biochimie*, 92: 538-44.

Reed, G. H., and S. D. Morgan. 1974. 'Kinetic and magnetic resonance studies of the interaction of oxalate with pyruvate kinase', *Biochemistry*, 13: 3537-41.

- Rees, M. L., J. Subramaniam, Y. Li, D. J. Hamilton, O. H. Frazier, and H. Taegtmeyer. 2015. 'A PKM2 signature in the failing heart', *Biochem Biophys Res Commun*, 459: 430-6.
- Regan-Klapisz, E., V. Krouwer, M. Langelaar-Makkinje, L. Nallan, M. Gelb, H. Gerritsen, A. J. Verkleij, and J. A. Post. 2009. 'Golgi-associated cPLA2 α regulates endothelial cell-cell junction integrity by controlling the trafficking of transmembrane junction proteins', *Mol Biol Cell*, 20: 4225-34.
- Revenu, C., R. Athman, S. Robine, and D. Louvard. 2004. 'The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 635-46.
- Ridley, A. J. 2006. 'Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking', *Trends Cell Biol*, 16: 522-9.
- Rose, S., R. E. Frye, J. Slattery, R. Wynne, M. Tippett, S. Melnyk, and S. J. James. 2014. 'Oxidative stress induces mitochondrial dysfunction in a subset of autistic lymphoblastoid cell lines', *Transl Psychiatry*, 4: e377.
- Rubin, L. L. 1992. 'Endothelial cells: adhesion and tight junctions', *Curr Opin Cell Biol*, 4: 830-3.
- Sauteur, L., A. Krudewig, L. Herwig, N. Ehrenfeuchter, A. Lenard, M. Affolter, and H. G. Belting. 2014. 'Cdh5/VE-cadherin promotes endothelial cell interface elongation via cortical actin polymerization during angiogenic sprouting', *Cell Rep*, 9: 504-13.
- Scholzen, T., and J. Gerdes. 2000. 'The Ki-67 protein: from the known and the unknown', *J Cell Physiol*, 182: 311-22.
- Schoors, S., U. Bruning, R. Missiaen, K. C. Queiroz, G. Borgers, I. Elia, A. Zecchin, A. R. Cantelmo, S. Christen, J. Goveia, W. Heggermont, L. Godde, S. Vinckier, P. P. Van Veldhoven, G. Eelen, L. Schoonjans, H. Gerhardt, M. Dewerchin, M. Baes, K. De Bock, B. Ghesquiere, S. Y. Lunt, S. M. Fendt, and P. Carmeliet. 2015. 'Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells', *Nature*, 520: 192-7.

Schulz, J., G. Sparmann, and E. Hofmann. 1975. 'Alanine-mediated reversible inactivation of tumour pyruvate kinase caused by a tetramer-dimer transition', *FEBS Lett*, 50: 346-50.

Serra, H., I. Chivite, A. Angulo-Urarte, A. Soler, J. D. Sutherland, A. Arruabarrena-Aristorena, A. Ragab, R. Lim, M. Malumbres, M. Fruttiger, M. Potente, M. Serrano, A. Fabra, F. Vinals, O. Casanovas, P. P. Pandolfi, A. Bigas, A. Carracedo, H. Gerhardt, and M. Graupera. 2015. 'PTEN mediates Notch-dependent stalk cell arrest in angiogenesis', *Nat Commun*, 6: 7935.

Shasby, D. M., S. S. Shasby, J. M. Sullivan, and M. J. Peach. 1982. 'Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability', *Circ Res*, 51: 657-61.

Shikata, Y., K. G. Birukov, A. A. Birukova, A. Verin, and J. G. Garcia. 2003. 'Involvement of site-specific FAK phosphorylation in sphingosine-1 phosphate and thrombin-induced focal adhesion remodeling: role of Src and GIT', *FASEB J*, 17: 2240-9.

Sidibe, A., H. Polena, K. Pernet-Gallay, J. Razanajatovo, T. Mannic, N. Chaumontel, S. Bama, I. Marechal, P. Huber, D. Gulino-Debrac, L. Bouillet, and I. Vilgrain. 2014. 'VE-cadherin Y685F knock-in mouse is sensitive to vascular permeability in recurrent angiogenic organs', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307: H455-63.

Siemerink, M. J., I. Klaassen, C. J. Van Noorden, and R. O. Schlingemann. 2013. 'Endothelial tip cells in ocular angiogenesis: potential target for anti-angiogenesis therapy', *J Histochem Cytochem*, 61: 101-15.

Simionescu, M., N. Simionescu, and G. E. Palade. 1975. 'Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature', *J Cell Biol*, 67: 863-85.

Stahl, A., K. M. Connor, P. Sapieha, J. Chen, R. J. Dennison, N. M. Krah, M. R. Seaward, K. L. Willett, C. M. Aderman, K. I. Guerin, J. Hua, C. Lofqvist, A.

Hellstrom, and L. E. Smith. 2010. 'The mouse retina as an angiogenesis model', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51: 2813-26.

Stevenson, B. R., J. D. Siliciano, M. S. Mooseker, and D. A. Goodenough. 1986. 'Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia', *J Cell Biol*, 103: 755-66.

Strilic, B., T. Kucera, J. Eglinger, M. R. Hughes, K. M. McNagny, S. Tsukita, E. Dejana, N. Ferrara, and E. Lammert. 2009. 'The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta', *Dev Cell*, 17: 505-15.

Suchting, S., C. Freitas, F. le Noble, R. Benedito, C. Breant, A. Duarte, and A. Eichmann. 2007. 'The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 3225-30.

Sun, Z., X. Li, S. Massena, S. Kutschera, N. Padhan, L. Gualandi, V. Sundvold-Gjerstad, K. Gustafsson, W. W. Choy, G. Zang, M. Quach, L. Jansson, M. Phillipson, M. R. Abid, A. Spurkland, and L. Claesson-Welsh. 2012. 'VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TAd', *J Exp Med*, 209: 1363-77.

Swift, M. R., and B. M. Weinstein. 2009. 'Arterial-venous specification during development', *Circ Res*, 104: 576-88.

Taddei, A., C. Giampietro, A. Conti, F. Orsenigo, F. Breviario, V. Pirazzoli, M. Potente, C. Daly, S. Dimmeler, and E. Dejana. 2008. 'Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5', *Nat Cell Biol*, 10: 923-34.

Tang, Q., Q. Ji, W. Xia, L. Li, J. Bai, R. Ni, and Y. Qin. 2015. 'Pyruvate kinase M2 regulates apoptosis of intestinal epithelial cells in Crohn's disease', *Dig Dis Sci*, 60: 393-404.

Taniguchi, K., Y. Ito, N. Sugito, M. Kumazaki, H. Shinohara, N. Yamada, Y. Nakagawa, T. Sugiyama, M. Futamura, Y. Otsuki, K. Yoshida, K. Uchiyama,

and Y. Akao. 2015. 'Organ-specific PTB1-associated microRNAs determine expression of pyruvate kinase isoforms', *Sci Rep*, 5: 8647.

Taylor, C. B., and E. Bailey. 1967. 'Activation of liver pyruvate kinase by fructose 1,6-diphosphate', *Biochem J*, 102: 32C-33C.

Tech, K., A. P. Tikunov, H. Farooq, A. S. Morrissy, J. Meidinger, T. Fish, S. C. Green, H. Liu, Y. Li, A. J. Mungall, R. A. Moore, Y. Ma, S. J. M. Jones, M. A. Marra, M. G. Vander Heiden, M. D. Taylor, J. M. Macdonald, and T. R. Gershon. 2017. 'Pyruvate Kinase Inhibits Proliferation during Postnatal Cerebellar Neurogenesis and Suppresses Medulloblastoma Formation', *Cancer Res*, 77: 3217-30.

Telo, P., F. Breviario, P. Huber, C. Panzeri, and E. Dejana. 1998. 'Identification of a novel cadherin (vascular endothelial cadherin-2) located at intercellular junctions in endothelial cells', *J Biol Chem*, 273: 17565-72.

Teslaa, T., and M. A. Teitell. 2015. 'Pluripotent stem cell energy metabolism: an update', *EMBO J*, 34: 138-53.

Tibbetts, A. S., and D. R. Appling. 2010. 'Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism', *Annu Rev Nutr*, 30: 57-81.

Troyanovsky, R. B., E. P. Sokolov, and S. M. Troyanovsky. 2006. 'Endocytosis of cadherin from intracellular junctions is the driving force for cadherin adhesive dimer disassembly', *Mol Biol Cell*, 17: 3484-93.

Tsukamoto, T., and S. K. Nigam. 1997. 'Tight junction proteins form large complexes and associate with the cytoskeleton in an ATP depletion model for reversible junction assembly', *J Biol Chem*, 272: 16133-9.

Tung, J. J., I. W. Tattersall, and J. Kitajewski. 2012. 'Tips, stalks, tubes: notch-mediated cell fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a006601.

Turner, D. A., and D. C. Adamson. 2011. 'Neuronal-astrocyte metabolic interactions: understanding the transition into abnormal astrocytoma metabolism', *J Neuropathol Exp Neurol*, 70: 167-76.

Ubezio, B., R. A. Blanco, I. Geudens, F. Stanchi, T. Mathivet, M. L. Jones, A. Ragab, K. Bentley, and H. Gerhardt. 2016. 'Synchronization of endothelial Dll4-Notch dynamics switch blood vessels from branching to expansion', *Elife*, 5.

Unterluggauer, H., S. Mazurek, B. Lener, E. Hutter, E. Eigenbrodt, W. Zwerschke, and P. Jansen-Durr. 2008. 'Premature senescence of human endothelial cells induced by inhibition of glutaminase', *Biogerontology*, 9: 247-59.

Vander Heiden, M. G., J. W. Locasale, K. D. Swanson, H. Sharfi, G. J. Heffron, D. Amador-Noguez, H. R. Christofk, G. Wagner, J. D. Rabinowitz, J. M. Asara, and L. C. Cantley. 2010. 'Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells', *Science*, 329: 1492-9.

Vasioukhin, V., C. Bauer, M. Yin, and E. Fuchs. 2000. 'Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion', *Cell*, 100: 209-19.

Venkiteswaran, K., K. Xiao, S. Summers, C. C. Calkins, P. A. Vincent, K. Pumiglia, and A. P. Kowalczyk. 2002. 'Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and beta-catenin', *Am J Physiol Cell Physiol*, 283: C811-21.

