

# AGRADECIMIENTOS

Estas son las primeras líneas de mi tesis doctoral, y no por ello tienen menos importancia que el resto. Es más, sin todas estas personas que citaré posteriormente nada de lo que vendrá a continuación tendría ningún sentido. Por ello quiero agradecer:

A Juan Pedro Bolaños, por su magnífica dirección del trabajo de tesis, por sus inagotables ideas y por ser una de las personas más eficientes que conozco. Ójala algún día pueda ser la mitad de la mitad de lo buen científico que tú eres.

A Ángeles Almeida, por su apoyo incondicional y porque sin ella este trabajo no sería tan bonito.

A los profesores Pablo Hueso, Marcial Llanillo y Carmen Arizmendi por introducirme en el mundo de la investigación. A Emilio Fernández, por todo su apoyo y por todas esas historias que nos cuenta y que ayudan a desconectar del trabajo diario.

A la Dra. Carol MacKintosh por acogerme en el laboratorio de Dundee y tratarme como a uno más de su grupo. A Salvador Moncada por su ayuda en la elaboración del artículo

A mis compañeros y excompañeros de laboratorio, que son muchos y cada cual más importante. A María, por todo lo que me ha enseñado, por todas esas excursiones del patetik team y por tener esa niña tan bonita que tanto nos ha alegrado. A Nacho, por todo lo que me enseñó sobre biología molecular y bases de datos, porque siempre que he necesitado algo ha estado ahí, pero sobre todo por aquellos miércoles de Guinness y todas las cervezas que nos hemos tomado después. A Mónica Resch, por su inagotable e impagable ayuda, por escucharme siempre que lo he necesitado y porque sin ti aún me quedaría, al menos, un año para acabar mi tesis. A Rubén, porque a parte de compañero ha sido un buen amigo, vas a ser un gran científico. A Julia, por tantos y tantos diálogos y por ser tan buena chica. A Carolina, por su ayuda con el artículo. A Seila, porque a

pesar de sus desvaríos es una gran chica que me ha hecho reír mucho, aún tenemos una apuesta pendiente. A Miguel Veas-etc, por esos partidos de fútbol y esas partidas de póker, has hecho más ameno mi último año en el laboratorio. A Patricia, por esas charlas sobre música y cine que tanto me gustan. A Verónica, porque a pesar del poco tiempo que lleva, ya sabe “chupar y montar”. A las “técnicos”; Mónica, Silvia, Carmen y Virginia por la alegría que transmiten cuando hacen su trabajo. A tod@s esos “extranjeros” que pasaron por el labo, a Dennis, compañero de viaje por Dublín, a Anna por su sensibilidad, a Élena, sí sí, a Nadja, Dina, Rita, Yanina, por el buen ambiente que supieron crear.

A toda esa gente, que siempre está ahí para ayudar en los experimentos, a Carmela por su ayuda con las inmunos, a las chicas del “cell sorting”, a los chicos del confocal, a la gente del animalario, a los que me han ayudado con los experimentos radiactivos y a Tomy por ayudarnos a preparar las prácticas.

A mis amigos de Salamanca, a Abi, a pesar de su desplante de la tesis, a Patri, que ya son muchos años juntos, y todos buenos, a Rosario y Adrián, a Isa, por esos abrazos que tanto me gusta darte, a Javi, porque me hacía falta un hombre entre tanta mujer, a Jose Ignacio, por nuestras pachanguillas. A los equipos de fútbol de Innova, del INCYL y de Traducción y al de basket del Cuenca por esas cenas y por contribuir un poco al “*mens sana in corpore sano*”.

A mis amigos de Ávila, por permitirme desconectar de la rutina salmantina. A Paco, por los musetes y por escucharme tantas veces. A Neftalí, porque siempre quiere tomarse una cerveza conmigo, ya sea en Ávila o en Frankfurt. A Futu y a Mimi por ganarme tantas veces al mus. A Angelito, por tragarse mis chapas y por esas noches de divagaciones transcendentales. A Luis, por ser tan buena persona. Y a todos los demás (Jaime, Raúl, Vicen, Paco Moranco, Gil, Johan, Toño, Jimeno, Juanan, Chachi, Turón, Mario, etc), por tantas y tantas noches de fiesta. A mi amiga Mabel, porque a pesar de la distancia siempre parece que está cerca. A Marcos por ayudarme a conocer la *nightlife* de Dundee.

A mis padres, sin los cuales nada de esto estaría sucediendo. Porque siempre me han apoyado en todas mis decisiones, haciéndolas mucho más fáciles de tomar. Os quiero.

Y por último, a la persona más importante, Lorena, porque necesitaría un libro entero para agradecerte todo lo que haces por mí, me apoyas cuando que lo necesito, me riñes cuando me porto mal, estás todos los días a mi lado y, sobre todo, me quieres siempre.



*"Si no te equivocas de vez en cuando, es que no lo intentas"*

**Woody Allen**



# ABREVIATURAS

<b>7-AAD</b>	7-amino-actinomicina D
<b><math>\Delta\psi_m</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial
<b>Akt</b>	Proteína kinasa B
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>AMPK</b>	AMP kinasa
<b>AD</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>APC/C</b>	Complejo promotor de la anafase
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de cerebro
<b>BSA</b>	Albúmina sérica
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DETA-NO</b>	(Z)-1-[2-(2-aminoetil)-(N)-(2-aminoetil) amino]-1-diazonio-1,2-diolato
<b>DHAP</b>	Dihidroxiacetona fosfato
<b>DIM-PIM</b>	Dihidrocloruro de dimetil pimelimidato
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNAsa</b>	Desoxirribonucleasa
<b>DTNB</b>	5,5'-ditio-bis-ácido 2-nitrobenzoico
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>F1,6Bpasa</b>	Fructosa 1,6 bisfosfatasa
<b>F1,6P<sub>2</sub></b>	$\beta$ -D-fructosa-1,6-bisfosfato
<b>F2,6Bpasa</b>	Fructosa 2,6 bisfosfatasa
<b>F2,6P<sub>2</sub></b>	$\beta$ -D-fructosa-2,6-bisfosfato
<b>F6P</b>	D-fructosa 6 fosfato
<b>FAD</b>	Flavin adenin dinucleótido
<b>FCS</b>	Suero fetal de ternera
<b>G3P</b>	Glicerol 3 fosfato
<b>G6P</b>	Glucosa 6 fosfato
<b>G6PD</b>	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
<b>GA3P</b>	Gliceraldehído 3 fosfato
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GAP43</b>	Proteína asociada a crecimiento-43
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
<b>GFAP</b>	Proteína fibrilar glial ácida
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GMP</b>	Guanosina monofosfato
<b>GSH</b>	Glutation reducido
<b>GSH-EE</b>	Glutation etil éster
<b>GSSG</b>	Glutation oxidado
<b>GSx</b>	Glutation
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>Het</b>	Dihidroetidina
<b>HIF-1</b>	Factor de hipoxia inducible 1
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento insulínico 1

<b>IMP</b>	Inosina monofosfato
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de disociación
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LKB1</b>	AMP kinasa kinasa
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MAP-2</b>	Proteína asociada a microtúbulos-2
<b>MCT</b>	Transportador de monocarboxilato
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotín adenín dinucleótido (oxidado)
<b>NADH</b>	Nicotín adenín dinucleótido (reducido)
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotín adenín dinucleótido fosfato (oxidado)
<b>NADPH</b>	Nicotín adenín dinucleótido fosfato (reducido)
<b>NMDA</b>	<i>N</i> -metil-D-aspartato
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierta
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDH</b>	Piruvato deshidrogenasa
<b>PEP</b>	Fosfoenol piruvato
<b>PFK1</b>	6-fosfofructo-1-kinasa
<b>PFK2</b>	Fosfofructokinasa 2
<b>Pfkfb</b>	6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa
<b>Pfkfb1</b>	6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-1
<b>Pfkfb2</b>	6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-2
<b>Pfkfb3</b>	6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-3
<b>Pfkfb4</b>	6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-4
<b>PGI</b>	Fosfoglucosa isomerasa
<b>Pi</b>	Fosfato inorgánico
<b>PKA</b>	Proteína kinasa A
<b>PKB</b>	Proteína kinasa B
<b>PKC</b>	Proteína kinasa C
<b>PPi</b>	Pirofosfato
<b>PPP</b>	Vía de las pentosas fosfato
<b>PRG1</b>	Progestina 1
<b>R5P</b>	Ribosa 5 fosfato
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAi</b>	RNA de interferencia
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensajero
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>S.E.M.</b>	Error estándar de la media
<b>shRNA</b>	<i>Small hairpin</i> RNA
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering</i> RNA
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TCA</b>	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
<b>TF</b>	Tampón fosfato
<b>TIM</b>	Triosa isomerasa
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidad máxima
<b>X5P</b>	Xilulosa 5 fosfato

# ÍNDICE

## Introducción

1. 6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (Pfkfb)
  - 1.1. Antecedentes históricos e importancia biológica
  - 1.2. Dominios de la Pfkfb
  - 1.3. Evolución filogenética
  - 1.4. Isoformas de la Pfkfb y su conservación genética
  - 1.5. Reacción catalizada por la Pfkfb
  - 1.6. Cofactores de la Pfkfb
  - 1.7. Activadores de la Pfkfb
  - 1.8. Inhibidores de la Pfkfb
  - 1.9. Isoforma de hígado
    - 1.9.1. Información general
    - 1.9.2. Secuencias y residuos de aminoácidos implicados en la actividad de la enzima
    - 1.9.3. Regulación
  - 1.10. Pfkfb2. Isoforma de corazón
    - 1.10.1. Información general
    - 1.10.2. Regulación
  - 1.11. Pfkfb3. Isoforma de cerebro
  - 1.12. Pfkfb4. Isoforma de testículos
    - 1.12.1. Información general
    - 1.12.2. Regulación
2. Pfkfb3. Isoforma de cerebro
  - 2.1. Información general
  - 2.2. Regulación de la Pfkfb3
    - 2.2.1. Regulación de la Pfkfb3 por fosforilación
    - 2.2.2. Regulación de la Pfkfb3 por HIF-1 $\alpha$
    - 2.2.3. Regulación hormonal de Pfkfb3
  - 2.3. Pfkfb3 y cáncer

- 2.4. Pfkfb3 en el metabolismo cerebral
  - 2.4.1. El cerebro: un tejido dependiente de glucosa
  - 2.4.2. El lactato como fuente de energía en neuronas
  - 2.4.3. La glucosa como fuente principal de energía en astrocitos
  - 2.4.4. Los oligodendrocitos: una célula consumidora de glucosa y lactato
- 2.5. Regulación diferencial de la glucólisis en neuronas y astrocitos

## **Hipótesis y objetivos**

## **Material y métodos**

1. Especie ensayada, condiciones del animalario y control de la edad gestacional
2. Preparación de los cultivos celulares
  - 2.1. Cultivo primario de neuronas
  - 2.2. Cultivo primario de astrocitos
  - 2.3. Cultivo de HEK293-T
3. Construcción de plásmidos
  - 3.1. RNA de interferencia
    - 3.1.1. Diseño de los “small hairpin RNA” (shRNA)
    - 3.1.2. Diseño de los “small interfering RNA” (siRNA)
  - 3.2. Sobreexpresión de proteínas
    - 3.2.1. Sobreexpresión de las variantes alternativas RB2K3 y RB2K6 de Pfkfb3
    - 3.2.2. Sobreexpresión de Cdh1
    - 3.2.3. Sobreexpresión de G6PD
  - 3.3. Mutagénesis dirigida
4. Transfección transitoria de células en cultivo
5. Tratamiento de las células
  - 5.1. Inhibición de la cadena transportadora de electrones
  - 5.2. Inhibición del proteosoma
  - 5.3. Inhibición de caspasas

6. Generación de un anticuerpo contra las variantes alternativas RB2K3 y RB2K6 de la Pfkfb3
7. Cuantificación cualitativa de RNAm mediante RT-PCR (Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa)
8. Electroforesis e inmunodetección de proteínas (Western Blot)
9. Inmunoprecipitación
10. Electroforesis y detección del RNAm (Northern Blot)
11. Inmunohistoquímica
12. Cuantificación de apoptosis mediante tinción con anexina y 7-amino-actinomicina D
13. Medida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )
14. Separación de poblaciones celulares mediante "Cell Sorting"
15. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)
16. Determinación de la concentración de metabolitos
  - 16.1. Determinación de la concentración de D-glucosa, D-glucosa-6-fosfato (G6P), D-fructosa-6-fosfato (F6P) y D-fructosa-1,6-bisfosfato (F1,6P<sub>2</sub>) y L-lactato
    - 16.1.1. Determinación de la concentración de D-glucosa
    - 16.1.2. Determinación de la concentración de G6P y F6P
    - 16.1.3. Determinación de la concentración de F1,6P<sub>2</sub>
    - 16.1.4. Determinación de la concentración de L-Lactato
  - 16.2. Determinación de la concentración de fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6P<sub>2</sub>)
  - 16.3. Determinación de la concentración de glutatión
17. Determinación del flujo glucolítico
  - 17.1. Grado de conversión de [6-<sup>14</sup>C]-glucosa a [<sup>14</sup>C]-lactato
  - 17.2. Producción de <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O a partir de [3-<sup>3</sup>H]-glucosa
18. Determinación de la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP)
19. Determinación de la actividad del complejo ubiquitina ligasa APC/C
20. Determinación de la concentración de proteínas
21. Análisis estadístico

## **Resultados**

1. Identificación de las isoformas de la Pfkfb que se expresan en neuronas y astrocitos.
2. Estudio de la expresión del RNAm de las variantes alternativas de la Pfkfb3 de neuronas y astrocitos.
3. Expresión de la proteína Pfkfb en neuronas y astrocitos
4. Pfkfb3 se degrada proteolíticamente en neuronas
5. Regulación de la glucólisis por la vía Cdh1-Pfkfb3
6. Influencia de la modulación de la glucólisis sobre la supervivencia neuronal
7. Pfkfb3 desequilibra el balance entre glucólisis y ciclo de las pentosas-fosfato, generando estrés oxidativo

## **Discusión**

1. Caracterización de la expresión de los RNA mensajeros y de las proteínas de las isoformas de la Pfkfb en neuronas y astrocitos.
2. Regulación de la estabilidad de la proteína Pfkfb3 por APC/C-Cdh1
3. Regulación de la glucólisis por la vía APC/C-Cdh1-Pfkfb3
4. Pfkfb3 y neuroprotección transitoria frente crisis bioenergética
5. La expresión de Pfkfb3 en neuronas induce apoptosis
6. Pfkfb3 desequilibra el balance entre glucólisis y ciclo de las pentosas-fosfato, generando estrés oxidativo
7. Implicaciones fisiopatológicas

## **Conclusiones**

## **Anexos**

1. Alineamiento esquemático de las secuencias de las isoformas de la Pfkfb en distintos organismos
2. Glucolisis
3. AMP Kinasa
4. Sistemas de defensa frente al estrés oxidativo y nitrosativo
5. Vía de las pentosas fosfato
6. Lanzadera de lactato
7. Vía ubiquitina-proteosoma
8. APC/C-Cdh1
9. Caspasas

## **Bibliografía**



# **INTRODUCCIÓN**





## **1. 6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (Pfkfb)**

### **1.1. Antecedentes históricos e importancia biológica**

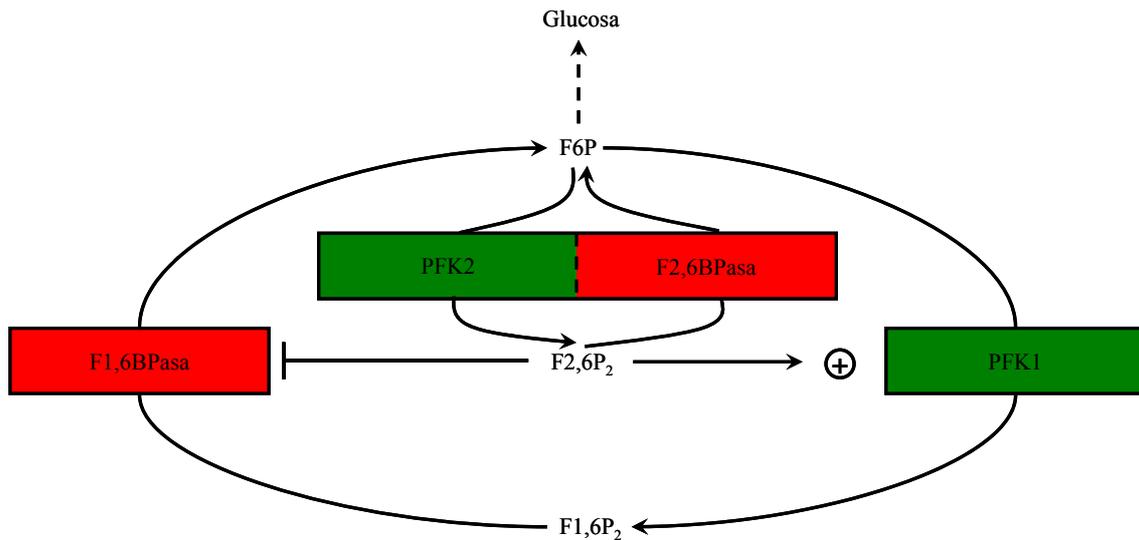
En 1980 Van Schaftingen, Hue y Hers realizaban experimentos para determinar el mecanismo a través del cual el glucagón activa la gluconeogénesis e inhibe la glucólisis en el hígado (Van Schaftingen y col., 1980b). En el transcurso de sus investigaciones obtuvieron de un extracto de hígado y por filtración en gel una molécula de bajo peso molecular que revertía los efectos del glucagón. Purificaron esta molécula y comprobaron que activaba a la 6-fosfofructo-1-kinasa (PFK1), razón por la cual estimulaba la glucólisis y, comprobaron que dicha molécula era la  $\beta$ -D-fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6P<sub>2</sub>) (Van Schaftingen y col., 1980a).

Poco después, en 1981, Pilkis y sus colaboradores corroboraron los experimentos de Van Schaftingen y demostraron que la F2,6P<sub>2</sub> funciona como un efector alostérico positivo de la PFK1 (Pilkis y col., 1981b). Asimismo y, paralelamente con el grupo de Van Schaftingen, demostraron que la F2,6P<sub>2</sub> se comporta como un efector alostérico negativo de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Pilkis y col., 1981a; Van Schaftingen y Hers 1981b). Además, Pilkis y sus colaboradores afirmaron que debía de existir una kinasa que fosforilara específicamente a la fructosa 6 fosfato (F6P) en el carbono 2.

Ese mismo año Furuya y Uyeda descubrieron en extractos de hígado una enzima que era capaz de producir  $F2,6P_2$  a partir de F6P y ATP-Mg. Esta enzima era diferente a la PFK1 y la llamaron fructosa-6-fosfato-2-kinasa (Furuya y Uyeda 1981). Durante 1981 El-Maghrabi y sus colaboradores purificaron esta enzima (El-Maghrabi y col., 1981) y, en agosto de ese año, Van Schaftingen y Hers corroboraron los experimentos de Furuya y bautizaron a la enzima con el nombre de fosfofructokinasa 2 (PFK2) (Van Schaftingen y Hers 1981a).

En 1982 Furuya y sus colaboradores descubrieron en extractos de hígado una enzima que cataliza la degradación de la  $F2,6P_2$  a F6P y Pi en presencia de  $Mg^{2+}$  y que se activaba por glucagón (Furuya y col., 1982). Ese mismo año Van Schaftingen y sus colaboradores comprobaron que la enzima encargada de degradar la  $F2,6P_2$  a F6P y Pi copurificaba con la PFK2 y la denominaron fructosa-2,6-bisfosfatasa (van Schaftingen y col., 1982a). Fue en 1983 cuando Pilkis y sus colaboradores observaron que ambas actividades, síntesis y degradación de la  $F2,6P_2$ , se encontraban presentes en una única enzima bifuncional a la que denominaron 6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (Pfkfb, EC 2.7.1.105/ EC 3.1.3.46) (Pilkis y col., 1983).

La Pfkfb es una de las cinco proteínas conocidas que catalizan dos reacciones opuestas, pero es la única cuya diana es un metabolito y no otra proteína. Es una enzima citosólica y es activa en forma homodimérica (El-Maghrabi y col., 1981; Van Schaftingen y col., 1981a). Es conocida por su importante papel en la regulación del metabolismo glucídico. Así, a través de la síntesis y degradación de  $F2,6P_2$ , la Pfkfb tiene una alta relevancia en el balance glucolisis/gluconeogénesis. El aumento de  $F2,6P_2$  activa la PFK1, y su disminución activa la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F1,6BPasa).



**Figura I.** Control del balance glucolisis/gluconeogénesis por la Pfkfb . Su actividad kinásica estimula la glucolisis, mientras que su actividad bisfosfatásica estimula la gluconeogénesis.

## 1.2. Dominios de la Pfkfb

El dominio kinasa, que ocupa la región N-terminal, está muy relacionado con la superfamilia de las proteínas de unión a mononucleótidos, con una relación particularmente cercana a las adenilato kinasas y a la región de unión a nucleótidos de las proteínas G (Hasemann y col., 1996). Los únicos sustratos de la región kinasa de la enzima son la F6P y sus epímeros y, de éstos, sólo la L-sorbosa-6-fosfato presenta una actividad significativa (Pilkis y col., 1985). El ATP es el donador de fosfato preferido, pero también puede utilizar GTP (El-Maghrabi y col., 1981) y ( $\gamma$ -S) ATP (Rider y col., 1988).

Por su parte, el dominio bisfosfatasa está relacionado con una familia de proteínas que incluye a las fosfoglicerato mutasas y a las fosfatasa ácidas G (Hasemann y col., 1996).

Existen al menos tres sitios de unión para F6P; dos en el dominio kinasa y uno en el dominio bisfosfatasa (Okar y col., 1995). La dimerización de esta enzima se

produce por el contacto entre los dominios kinasa de la proteína, no pareciendo existir ningún contacto en los dominios bisfosfatasa (Okar y col., 2001).

### **1.3. Evolución filogenética**

Diversos resultados de análisis bioinformáticos y de bases de datos genómicas sugieren que, en un antecesor de todos los eucariotas, distintos genes codificaban para la fructosa-2,6-bisfosfatasa y para la 6-fosfofructo-2-kinasa (Michels y Rigden 2006). Estos genes después se fusionaron en un solo gen. Más tarde, en distintas líneas filogenéticas ocurrieron duplicaciones del gen permitiendo el desarrollo de distintas isoformas que se expresarán en diversos tejidos.

Independientemente de esta evolución, en diferentes líneas de eucariotas unicelulares se produjeron sustituciones o deleciones de residuos de sitios catalíticos críticos que llevaron a la supresión de una de las actividades de la enzima. Además de la región central de la enzima, que está altamente conservada, la Pfkfb tiene extremos amino y carboxilo que no están conservados y que difieren en gran medida entre las distintas isoformas y las diferentes especies. Particularmente, el extremo amino varía considerablemente en longitud y ha adquirido motivos que, de manera específica de la especie y de la isoforma, pueden ser responsables de regular las actividades catalíticas por fosforilación, por unión específica al ligando o mediando la interacción proteína:proteína. El gen de la Pfkfb se encuentra en casi todos los eucariotas, pero está ausente en procariotas excepto en *Trypanosoma brucei* y *Euglena gracilis* (Michels y Rigden 2006).

### **1.4 Isoformas de la Pfkfb y su conservación genética**

La Pfkfb consta de cuatro isoformas cuyo grado de expresión varía según el tejido en que se encuentren. En la tabla I podemos observar los tejidos donde se expresan mayoritariamente estas isoformas.

PROTEÍNA	GEN	TEJIDOS DONDE LA EXPRESIÓN ES MAYORITARIA	RELACIÓN ACTIVIDAD KINÁSICA/ BISFOSFATÁSICA	
Pfkfb1	<i>Pfkfb1</i>	Hígado	Músculo	Hígado
		Músculo		
		Feto	0,4	2,5
Pfkfb2	<i>Pfkfb2</i>	Corazón	Entre 1,8 y 6,1	
		Riñón		
		Islotes pancreáticos		
Pfkfb3	<i>Pfkfb3</i>	Cerebro	Cerebro	Placenta de
		Placenta	bovino	humano
		Líneas tumorales		
		Monocitos	3,1	710
		Células de Kupffer		
Pfkfb4	<i>Pfkfb4</i>	Testículos	Humano	Rata
			0,8	4,1

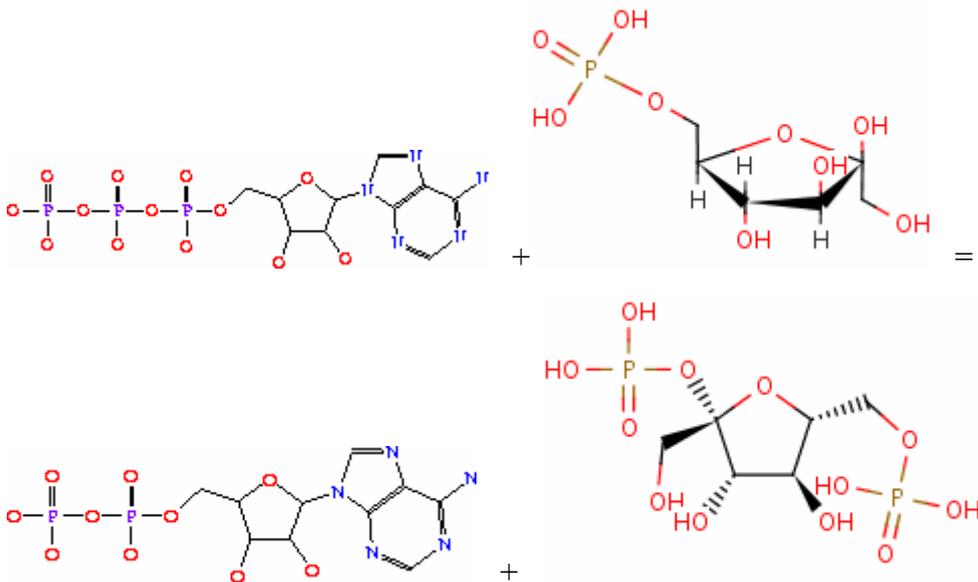
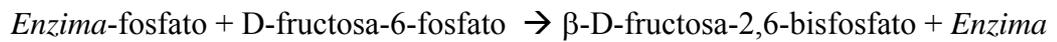
**Tabla I.** Isoformas de la Pfkfb, tejidos en los que se expresan y relación entre sus actividades kinásica y bisfosfatásica (Okar y col., 2001).

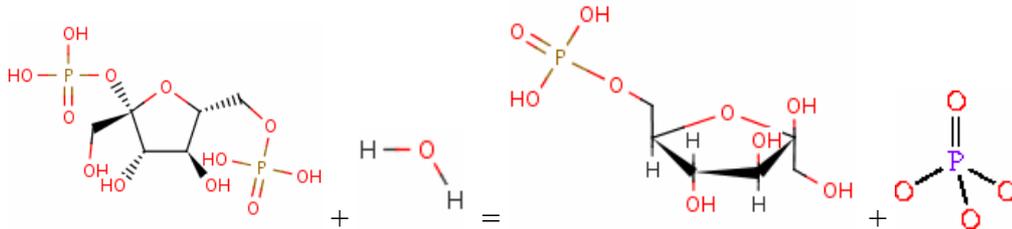
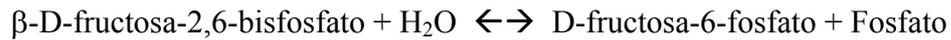
Estas isoformas difieren en la secuencia de aminoácidos de sus extremos amino y carboxilo, y parecen jugar un importante papel en la optimización de la disponibilidad de glucosa en los tejidos donde se expresan.

La Pfkfb está muy conservada. Así, la isoforma de hígado humano tiene una similitud del 98,3 y 97 % con la de rata y bovina, respectivamente; y del 89,1 % con la de pollo. En el anexo 1 se puede observar el alineamiento esquemático de las secuencias de las isoformas de la Pfkfb en distintos organismos.

## 1.5. Reacción catalizada por la Pfkfb

Como ya se mencionó anteriormente, la Pfkfb es una enzima bifuncional que cataliza la síntesis e hidrólisis de la  $\beta$ -D-fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6P<sub>2</sub>). Realiza su función mediante la transferencia de un fosfato en posición  $\gamma$  del ATP sobre el grupo hidroxilo del carbono en posición 2 de la D-fructosa-6-fosfato.





Para la formación del intermediario *Enzima-fosfato* es indispensable la unión covalente del fosfato a una histidina que se encuentra en el inicio del dominio bisfosfatasa (Okar y col., 1995) (ver anexo 2).

### 1.6. Cofactores de la Pfkfb

El AMP (Van Schaftingen y col., 1981b; Laloux y col., 1985; Rider y col., 1988), el ATP (Manes y El-Maghrabi 2005; Payne y col., 2005), el GMP (Laloux y col., 1985) y el IMP (Laloux y col., 1985) actúan como cofactores de la Pfkfb y, tanto el ión  $\text{Mg}^{2+}$  como el fosfato son necesarios para la actuación de esta enzima, pudiendo ser sustituido el fosfato por arsenato, pero no por sulfato u otros ésteres de fosfato (Laloux y col., 1985). La presencia del fosfato incrementa la velocidad máxima de la enzima (siendo cero en ausencia del mismo) y reduce la  $K_m$  para F6P.

### 1.7. Activadores de la Pfkfb

El ATP activa a la isoforma de hígado de *Gallus gallus*, pero no la de *Rattus norvegicus* (Zhu y col., 2001). Altas concentraciones de glucosa activan la isoforma de hígado de *R. norvegicus*, incrementando las concentraciones de F2,6P<sub>2</sub> y el flujo glucolítico (Harada y col., 1997). Además, la glucosa estimula la desfosforilación de la

Pfkfb por la proteína fosfatasa 2A que, a su vez, necesita de la xilulosa-5-fosfato (X5P) para llevar a cabo su función (Nishimura y Uyeda 1995). Por último, la isoforma de corazón de *B. taurus* se activa por fosforilación en Ser<sup>466</sup> y Ser<sup>483</sup> por insulina a través de la kinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítido (Bertrand y col., 1999).

### 1.8. Inhibidores de la Pfkfb

Se conocen una gran variedad de inhibidores. Así, el 6-fosfogluconato inhibe la actividad bisfosfatásica de la enzima sin ejercer ningún efecto sobre la actividad kinásica en *R. norvegicus* (Sakurai y col., 1996). El ADP compite con el ATP en *R. norvegicus* y, además funciona como inhibidor no competitivo con la F6P, produciendo la inhibición de la actividad kinásica (Kitajima y col., 1984; Kretschmer y Hofmann 1984; Pilkis y col., 1984). En *E.coli* el MgATP<sup>2-</sup> inhibe la enzima cuando la concentración de F6P es baja (0,1 mM) y el ATP<sup>4-</sup> inhibe a bajas y altas concentraciones de F6P (4 mM) (Guixe y Babul 1985). Por otra parte, en *S. cerevisiae* al ATP inhibe a la enzima a bajas concentraciones de Mg<sup>2+</sup> y F6P (Bedri y col., 1989).

La F2,6P<sub>2</sub> inhibe de un modo no competitivo la actividad kinásica de la enzima en *R. norvegicus* (Kitajima y col., 1984; Pilkis y col., 1984; Laloux y col., 1985), y la F6P inhibe también de manera no competitiva la actividad bisfosfatásica en *R. norvegicus* (El-Maghrabi y col., 1984) y en la isoforma de cerebro de *B. taurus* (Ventura y col., 1992)

El citrato es un potente inhibidor no competitivo de la enzima de *R. norvegicus*, siendo más sensible la isoforma de corazón que la de hígado (Van Schaftingen y col., 1981a; Laloux y col., 1985; Rider y col., 1985). Además, el citrato inhibe la actividad kinásica y activa la bisfosfatásica en *B. taurus* (Ventura y col., 1992). El PEP compite con la F6P en *H. sapiens* inhibiendo la enzima (Manes y El-Maghrabi 2005), en *R. norvegicus* reduce la actividad máxima de la enzima (Van Schaftingen y col., 1981a; Kretschmer y Hofmann 1984; Laloux y col., 1985; Sakurai y col., 1996) y, en *S. cerevisiae*, causa una inactivación del 60% en la actividad de la enzima (Aragon y col., 1987; Bedri y col., 1989).

El glicerol-3-fosfato (G3P) inhibe la actividad kinásica y estimula la actividad bisfosfatásica de la isoforma de hígado en *B. taurus* (Kountz y col., 1985; Ventura y col., 1992) y en *R. norvegicus* (Claus y col., 1982; van Schaftingen y col., 1982a; Pilkis y col., 1984; Rider y col., 1985), ya que no permite la unión de la F6P a la enzima. Además también inhibe el 35% de la actividad en *S. cerevisiae* (Aragon y col., 1987).

En *R. norvegicus*, el glucagón incrementa la concentración de AMP cíclico, que a su vez activa a la PKA, que fosforila a la Ser32 de la isoforma de hígado inhibiendo la actividad kinásica de la enzima (Payne y col., 2005) y estimulando la actividad bisfosfatásica (Hers y Van Schaftingen 1982; Claus y col., 1984).

## **1.9 Pfkfb1. Isoforma de hígado**

### *1.9.1. Información general*

El nombre de la proteína es 6-fosfofructo-2-kinasa/2,6-bisfosfatasa 1 o PFK2.1. Se encuentra mayoritariamente en hígado y músculo. En *R. norvegicus* y *Mus musculus* hay dos variantes alternativas que difieren en los primeros aminoácidos de la región amino (dominio kinasa), cuyas longitudes de la secuencia son 471 y 448 aminoácidos respectivamente. En *H. sapiens* y *B. taurus* la longitud de la secuencia también es de 471 aminoácidos, aunque no hay variantes alternativas. En todas estas especies el dominio kinasa está en los primeros 250 aminoácidos, mientras que el dominio bisfosfatasa está entre los aminoácidos 251 y 471. Además, en todas ellas están descritos dos sitios de unión a F6P en la argininas en posición 105 y 196 y, el sitio de unión ATP, está entre los aminoácidos 49 y 56. También, se ha sugerido la existencia de una tercera arginina de unión a F6P en la posición 225 (Rider y col., 1995).

Especie	Variantes alternativas	Cromosoma	Exones	Tamaño de transcrito (pares de bases)	Tamaño de la proteína (Aminoácidos)
<i>R. norvegicus</i>	1	X	14	1891	471
	2	X	14	1687	448
<i>M. musculus</i>	1	X	14	1654	471
	2	X	14	1721	448
<i>H. sapiens</i>		X	14	1733	471
<i>B. taurus</i>		X	14	1834	471

**Tabla II.** Información genética y proteica de la isoforma Pfkfb1 en varias especies. En la tabla se puede observar cómo el gen que codifica para esta proteína siempre está en el cromosoma X. Su número de exones tampoco difiere entre estas especies, siendo siempre 14, y aparecen dos variantes alternativas en rata y en ratón.

### 1.9.2 Secuencias y residuos de aminoácidos implicados en la actividad de la enzima

Existen unos motivos altamente conservados en las isoformas de la Pfkfb que tienen una gran importancia en la regulación de la enzima. Así, los aminoácidos del 49 al 56 forman una secuencia de unión a nucleótidos también conocida como motivo Walker A (GX<sub>4</sub>GKS/T) (Vertommen y col., 1996). También existe un segundo motivo Walker A que se encuentra en el dominio bisfosfatasa (Gly274-Lys280) y puede desarrollar la función de estimular la actividad bisfosfatásica cuando se une a GTP. Por último, existe otro dominio de unión a nucleótidos alrededor de la posición del Asp<sup>130</sup> y su secuencia es similar al motivo de unión a nucleótidos Walker B (Rider y col., 1994).

Existen otros residuos implicados en la regulación de la enzima cuyas funciones se recogen en la siguiente tabla (Bazan y col., 1989; Li y col., 1992; Lin y col., 1992; Bertrand y col., 1997).

Residuo	Mutación	Efecto
Lys <sup>54</sup>	Met	Impide la unión del ATP. Disminuye 5000 veces la actividad kinásica
Thr <sup>55</sup>	Val Ser Cys	Disminuye 5000 veces la actividad kinásica
Asp <sup>130</sup>	Ala	Impide la unión del Mg <sup>2+</sup> . Disminuye la actividad kinásica
Lys <sup>174</sup>	Gly	Estabiliza el estado de transición. Disminuye 4000 veces la Vmax
Asp <sup>179</sup>	Ala	Disminuye 1000 veces la K <sub>m</sub> para F2,6P <sub>2</sub>
Asp <sup>191</sup>	Ala	Disminuye 2000 veces la K <sub>m</sub> para F2,6P <sub>2</sub>
Lys <sup>356</sup>	Ala	Incrementa 3000 veces la K <sub>m</sub> para F2,6P <sub>2</sub> y la K <sub>i</sub> para F6P
Arg <sup>352</sup>	Ala	Incrementa 3000 veces la K <sub>m</sub> para F2,6P <sub>2</sub> y la K <sub>i</sub> para F6P
Arg <sup>360</sup>	Ala	Incrementa 10 veces la K <sub>m</sub> para F2,6P <sub>2</sub> y 12 veces la K <sub>i</sub> para F6P
Arg <sup>257</sup>	Ala	Incrementa la K <sub>m</sub> para F2,6P <sub>2</sub> y la K <sub>i</sub> para Pi. Aumenta 11 veces la Vmax
Arg <sup>307</sup>	Ala	Incrementa la K <sub>m</sub> para F2,6P <sub>2</sub> y la K <sub>i</sub> para el Pi. Disminuye 700 veces la Vmax

**Tabla III.** Aminoácidos que desarrollan un papel importante en la función de la Pfkfb1. En la tabla se pueden observar los residuos implicados en la unión a ATP, Mg<sup>2+</sup>, Pi, F6P o F2,6P<sub>2</sub>. Se ha podido determinar la función de estos aminoácidos gracias a las mutaciones de los mismos a otros aminoácidos.

### 1.9.3. Regulación

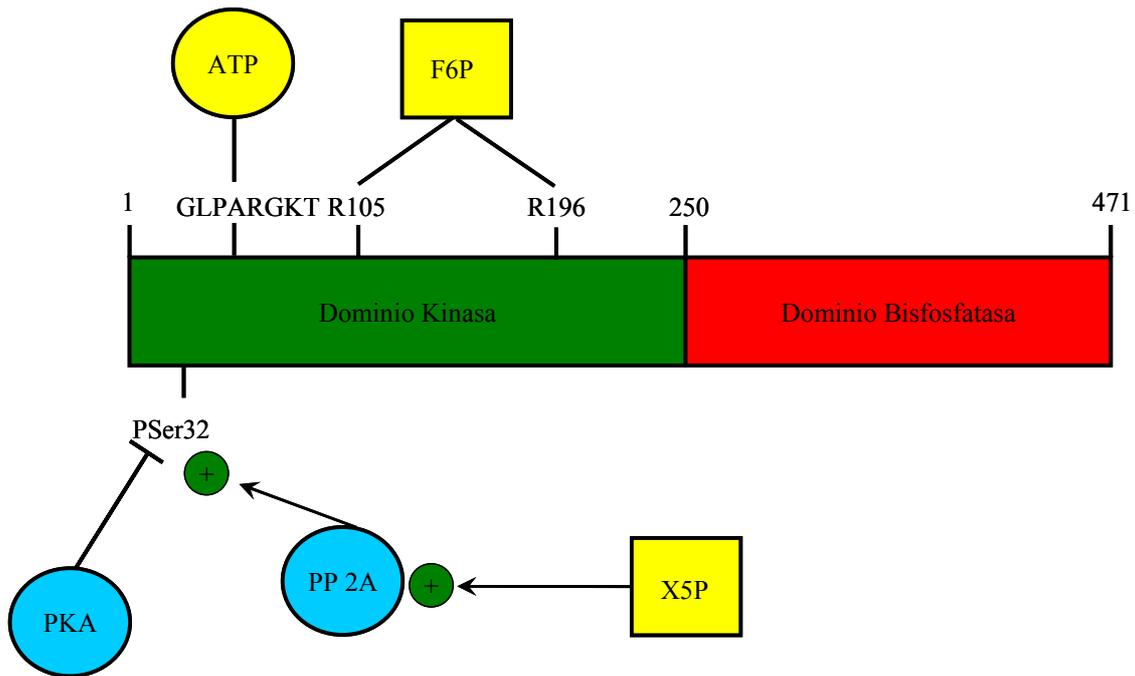
Los niveles de insulina, glucagón, glucosa y X5P determinan el estado de fosforilación de esta enzima en la Ser<sup>32</sup> y, con ello, los niveles de F2,6P<sub>2</sub> (Okar y col., 2004). Cuando la enzima está fosforilada en esta serina, se produce la estimulación de la actividad bisfosfatásica y, en consecuencia, se consume F2,6P<sub>2</sub>. Al contrario, cuando la

enzima se encuentra desfosforilada en Ser<sup>32</sup>, se produce la estimulación de la actividad kinásica y aumentan los niveles de F2,6P<sub>2</sub>.

El glucagón promueve la fosforilación de la Pfkfb1 en la Ser<sup>32</sup> por la PKA. Esta fosforilación lleva al descenso en la concentración de F2,6P<sub>2</sub> y, en consecuencia, al incremento de la concentración de F6P y a la activación de la gluconeogénesis. Por su parte, la insulina promueve la activación de la fosfatasa 2A que desfosforila a la Pfkfb1 en la Ser<sup>32</sup>, incrementando la concentración de F2,6P<sub>2</sub> y, en consecuencia, de F1,6P<sub>2</sub> lo que activa la glucolisis (Assimacopoulos-Jeannet y Jeanrenaud 1990). Este aumento de la glucolisis también se produce cuando incrementa la concentración de glucosa, que promueve el incremento en la concentración de X5P que, a su vez, activa a la fosfatasa 2A (Nishimura y col., 1994) que desfosforila la Ser<sup>32</sup> de la Pfkfb1 (Kabashima y col., 2003).

Por otra parte, se ha observado que la Pfkfb1 es capaz de unirse a la glucokinasa, activándola y facilitando su translocación desde el núcleo (Okar y col., 2009). Este efecto requiere la forma desfosforilada en la Ser<sup>32</sup> de la Pfkfb1. La unión de Pfkfb1 con la glucokinasa produce la activación de ambas enzimas (Baltrusch y col., 2001; Smith y col., 2007).

Por último, la Pfkfb1 puede ser regulada por ADP-ribosilación (Rosa y col., 1995). La ADP-ribosilación se produce en los residuos Arg<sup>29</sup> y Arg<sup>30</sup>, y evita la fosforilación por PKA, haciendo disminuir la actividad kinásica de la enzima, pero no la bisfosfatásica. Estos resultados indican que la ADP-ribosilación implica un mecanismo de regulación electrostático o estérico de la enzima totalmente independiente de la fosforilación.



**Figura II.** Estructura de la Pfkfb1, lugares de unión a ATP y F6P y su regulación por fosforilación. En la figura se puede observar la importancia de la Ser<sup>32</sup> en la regulación de esta isoforma, ya que su fosforilación por PKA inactiva la actividad kinásica, y su desfosforilación estimula dicha actividad.

## 1.10. Pfkfb2. Isoforma de corazón

### 1.10.1. Información general

El nombre de la proteína es 6-fosfofructo-2-kinasa/2,6-bisfosfatasa 2 o PFK2.2. Se encuentra mayoritariamente en corazón, riñón e islotes pancreáticos. En *R. norvegicus* existen 4 variantes alternativas cuya secuencia tiene un tamaño de entre 474 y 557 aminoácidos y que difieren en la región carboxilo terminal de la proteína. En *Homo sapiens* existen dos variantes alternativas, cuyas secuencias tienen un tamaño de 505 y 471 aminoácidos respectivamente. En *Mus musculus* no hay variantes alternativas y la secuencia tiene un tamaño de 519 aminoácidos. Por último, *Bos taurus* también carece de variantes alternativas y, el tamaño de su secuencia, es de 531 aminoácidos. El dominio kinasa tiene un tamaño de 251 aminoácidos en *R. norvegicus* y *Mus musculus*,

de 248 aminoácidos en *H.sapiens* y de 249 aminoácidos en *Bos taurus*. Por su parte, el tamaño del dominio bisfosfatasa es muy variable. En *R. norvegicus* y en *Mus musculus* están descritos los sitios de unión a F6P en los residuos Arg<sup>105</sup> y Arg<sup>196</sup> (las mismas que en Pfkfb1), mientras que en *H. sapiens* están en los residuos Arg<sup>102</sup> y Arg<sup>193</sup> y en *Bos taurus* están en los residuos Arg<sup>103</sup> y Arg<sup>194</sup>. El lugar de unión al ATP se encuentra entre las posiciones 48 y 55 en *R. norvegicus* y *Mus musculus*, entre las posiciones 45 y 52 en *Homo sapiens* y entre las posiciones 46 y 53 en *Bos taurus*, siendo en todas las especies la secuencia de unión GLPARGKT.

Especie	Variante alternativa	Cromosoma	Exones	Tamaño de transcrito (pares de bases)	Tamaño de la proteína (aminoácidos)
<i>R. norvegicus</i>	1	XIII	15	2495	519
	2	XIII	16	1862	534
	3	XIII	17	1931	557
	4	XIII	16	3575	474
<i>M. musculus</i>		I	16	4506	518
<i>H. sapiens</i>	1	I	15	7073	505
	2	I	15	3494	471
<i>B. taurus</i>		XVI	16	3399	531

**Tabla IV.** Información genética y proteica de la isoforma Pfkfb2 en varias especies. En la tabla se puede observar que el gen que codifica para esta proteína se encuentra en cromosomas diferentes en función de la especie. El número de exones que codifican esta proteína oscila entre los 15 y los 17 y aparecen 4 variantes alternativas en rata y dos en humano.

### 1.10.2. Regulación

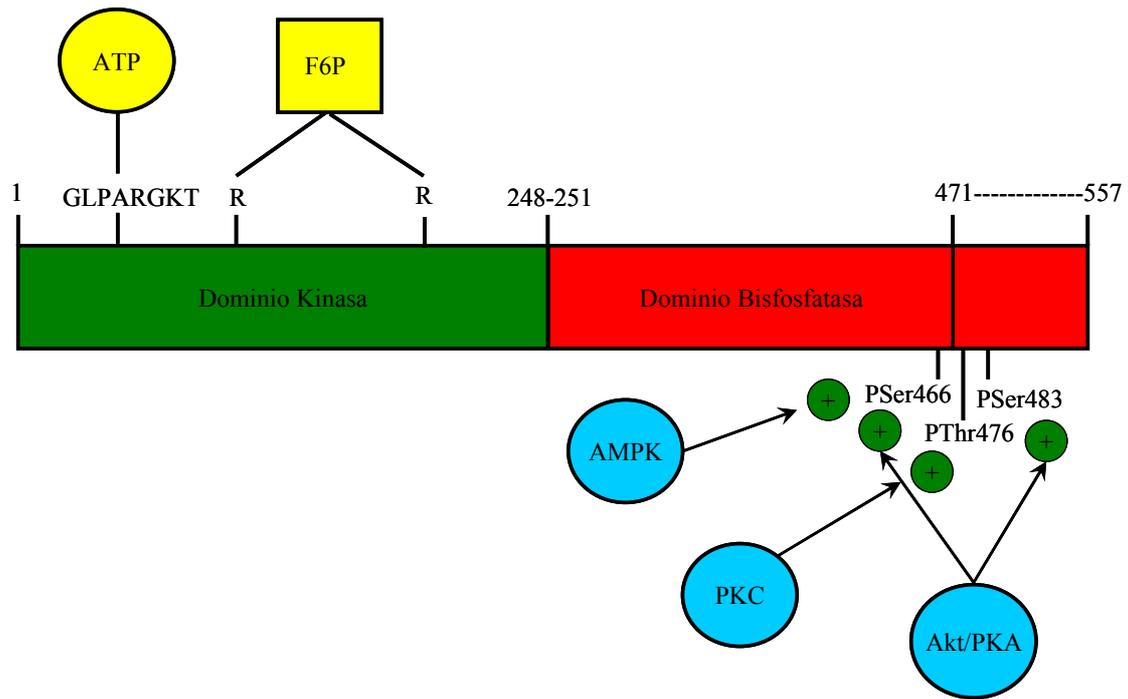
Al contrario que la Pfkfb1, la fosforilación de la Pfkfb2 resulta en la estimulación de la actividad kinásica. Las serinas fosforiladas en este caso son la Ser<sup>466</sup> en *H. sapiens* (Ser<sup>469</sup> en *R. norvegicus* y *Mus musculus*, y Ser<sup>467</sup> en *Bos taurus*) y la Ser<sup>483</sup> (Ser<sup>486</sup> en *R. norvegicus* y *Mus musculus*, y Ser<sup>484</sup> en *Bos taurus*). La Ser<sup>466</sup> puede

ser fosforilada por AMP kinasa (AMPK) en condiciones de isquemia y por proteína kinasa B (PKB ó Akt) en condiciones de gran carga de trabajo para el corazón.

La hipoxia, a través del aumento en la razón AMP/ATP activa la AMPK que, a su vez, fosforila a la Pfkfb2 en la Ser<sup>466</sup> estimulando la actividad kinásica de esta enzima. La Pfkfb2 fosforilada promueve el incremento en la concentración de F2,6P<sub>2</sub> y activa a la glucolisis restaurándose la razón AMP/ATP (Marsin y col., 2000).

En condiciones de isquemia, la insulina y el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) permiten al corazón sobrevivir mediante varios mecanismos, entre los que se incluye la activación de la ruta de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI 3-kinasa). Akt, una vez activo, fosforila Pfkfb2 en Ser<sup>466</sup> y Ser<sup>483</sup> incrementando su velocidad máxima y su afinidad por la F6P (Deprez y col., 1997). Además se ha comprobado que, cuando Pfkfb2 se fosforila en la Ser<sup>483</sup> por Akt, se une a las proteínas 14-3-3s y se activa, promoviendo el aumento de F2,6P<sub>2</sub> (Pozuelo Rubio y col., 2003).

La variante alternativa 1, pero no la 2, de la Pfkfb2 de *H. sapiens* puede ser activada en repuesta a adrenalina cuando es fosforilada por PKA en las Ser<sup>466</sup> y Ser<sup>483</sup> (Deprez y col., 1997). Por otra parte, la fosforilación de Pfkfb2 por PKA (Ser<sup>466</sup>) y por proteína kinasa C (Thr<sup>476</sup>) estimula la actividad kinásica. La fosforilación llevada a cabo por la PKA resulta en un descenso de la K<sub>m</sub> para la F6P, sin cambios en la velocidad máxima de la enzima, pero la fosforilación por PKC si que aumenta la Vmax (Kitamura y col., 1988).



**Figura III.** Estructura de la Pfkfb2, lugares de unión a ATP y F6P y su regulación por fosforilación. En la figura se puede observar la importancia de tres residuos: la Ser<sup>466</sup>, que puede ser fosforilada por AMP kinasa, PKA y Akt, produciéndose en todos los casos la estimulación de la actividad kinásica; la Ser<sup>483</sup> que puede ser fosforilada por PKA y Akt y en ambos casos también se produce la estimulación de la actividad kinásica; y por último la Thr<sup>476</sup> que al ser fosforilada por PKC también produce la estimulación de la actividad kinásica.

### 1.11. Pfkfb3. Isoforma de cerebro

Debido a que esta isoforma es el objeto principal del estudio en esta memoria, le dedicamos una sección especial más adelante.

### 1.12. Pfkfb4. Isoforma de testículos

#### 1.12.1. Información general

El nombre de la proteína es 6-fosfofructo-2-kinasa/2,6-bisfosfatasa 4 o PFK2.4. Se encuentra mayoritariamente en testículos. En *R. norvegicus* y *H. sapiens* la longitud

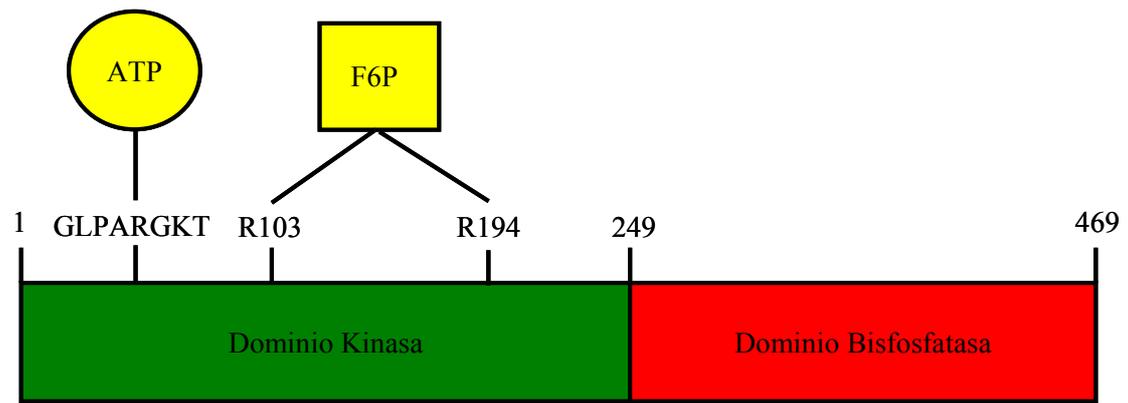
de la secuencia es de 469 aminoácidos y carecen de variantes alternativas. Por su parte, existen 2 variantes alternativas en *M. musculus* cuyas secuencias tienen una longitud de 221 y 469 aminoácidos respectivamente, aunque algunos autores afirman la existencia de 6 variantes alternativas (Minchenko y col., 2004). El dominio kinasa tiene un tamaño de 249 aminoácidos en *R. norvegicus*, *H. sapiens* y en la variante alternativa 1 de *M. musculus*, mientras que la región bisfosfatasa en estos casos tiene un tamaño de 220 aminoácidos. Las argininas de unión a F6P se encuentran en las posiciones 103 y 194, mientras que el sitio de unión a ATP está entre las posiciones 46 y 53.

Especie	Variante alternativa	Cromosoma	Exones	Tamaño de transcrito (pares de bases)	Tamaño de la proteína (Aminoácidos)
<i>R. norvegicus</i>		VIII	15	1739	469
<i>M. musculus</i>	1	IX	16	3271	469
	2	IX	8	666	221
<i>H. sapiens</i>		III	14	3481	469

**Tabla V.** Información genética y proteica de la isoforma Pfkfb4 en varias especies. En la tabla se puede observar cómo el gen que codifica para esta proteína se encuentra en cromosomas diferentes en función de la especie. El número de exones que codifican esta proteína oscila entre los 8 y los 16 y aparecen 2 variantes alternativas en ratón.

### 1.12.2. Regulación

Los niveles de RNA mensajero de esta isoforma aumentan por hipoxia en varias líneas celulares diferentes (PC-3, células HeLa, líneas celulares de hematoma), a través de un mecanismo en el que está inhibido el factor de transcripción HIF-1 (Minchenko y col., 2004).



**Figura IV.** Estructura de la Pfkfb2 y los lugares de unión a ATP y F6P.

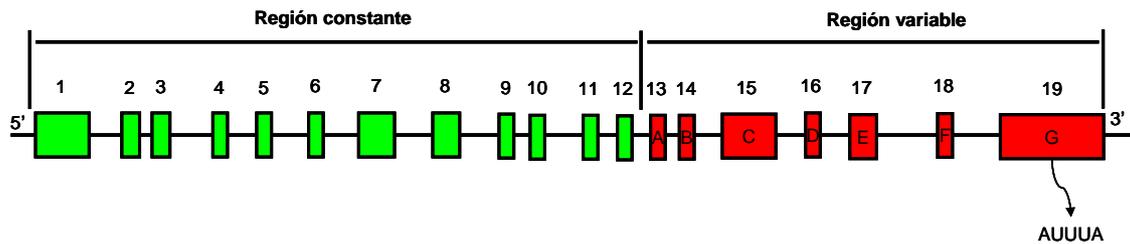
## 2. Pfkfb3. Isoforma de cerebro

### 2.1 Información general

El nombre de la proteína es 6-fosfofructo-2-kinasa/2,6-bisfosfatasa 3 o PFK2.3. Se encuentra mayoritariamente en cerebro, placenta y diversas líneas celulares. En *R. norvegicus* se han descrito 8 variantes alternativas cuya longitud de la secuencia oscila entre 513 y 555 aminoácidos (Watanabe y col., 1997). En *H.sapiens* se han descrito 6 variantes alternativas, cuyas longitudes de la secuencia varían entre 462 y 527 aminoácidos. En *Bos taurus* no se han descrito variantes alternativas, y la longitud de la secuencia es de 463 aminoácidos. Por último, en *M. musculus* se han descrito 6 variantes alternativas cuyas longitudes en la secuencia varían entre 513 y 542 aminoácidos (Mykhalchenko y col., 2008). El dominio kinasa tiene en todas estas especies una longitud de 245 aminoácidos, excepto en *Bos taurus*, cuya longitud es de 246 aminoácidos. La longitud del dominio bisfosfatasa es muy variable. Las argininas de unión a F6P están en las posiciones 99 y 190 (191 en *B. taurus*), y el dominio de unión a ATP está entre las posiciones 42 y 49.

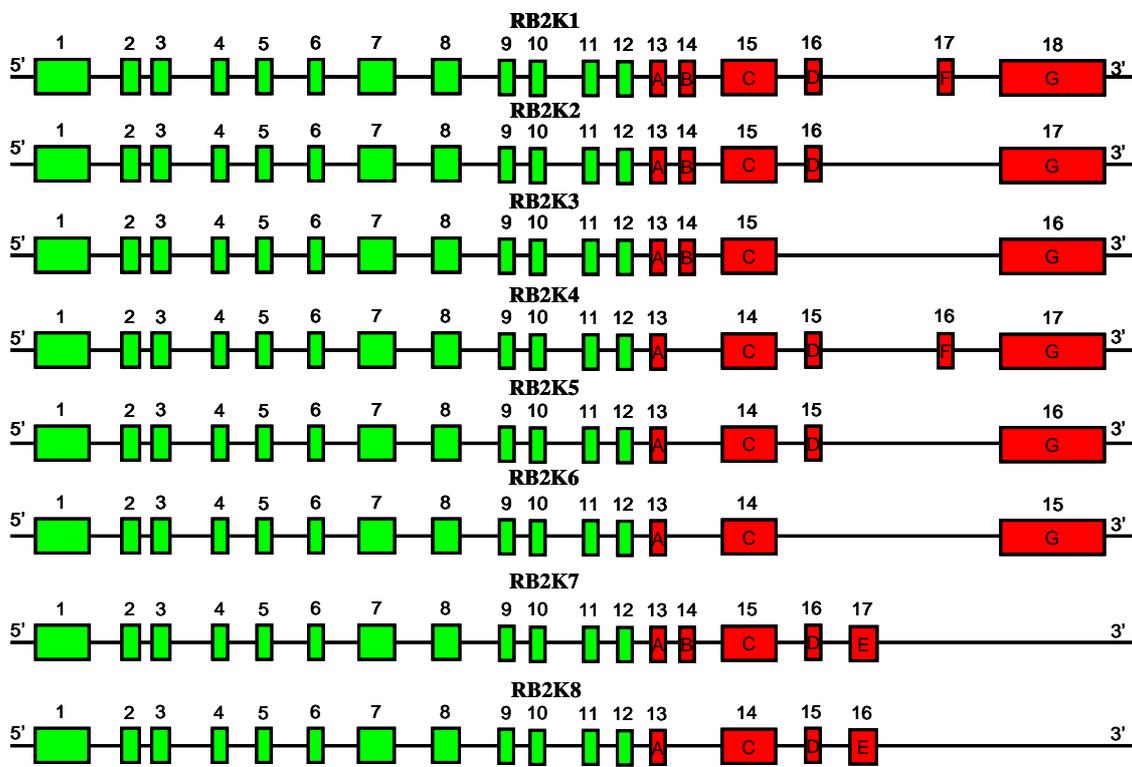
En *H. sapiens* hay 6 variantes alternativas que se nombran como UBI2K1, UBI2K2, UBI2K3, UBI2K4, UBI2K5 y UBI2K6. Las isoformas conocidas como PFK-2 ubicua (uPFK-2) y PFK-2 inducible (iPFK-2) son UBI2K5 y UBI2K4, respectivamente. La uPFK-2 es la mayoritaria en cerebro, placenta y en células de cáncer de mama. Estas variantes alternativas se forman por el procesamiento alternativo de 8 exones del gen de la Pfkfb3 (A-G). La iPFK-2, por su parte, juega un papel muy importante en la proliferación de tumores (Kessler y Eschrich 2001), y se distingue por la presencia de múltiples copias de la secuencia AUUUA en la región 3'UTR que confieren inestabilidad al RNA mensajero (Chesney y col., 1999). A continuación podemos ver esquemáticamente la distribución de exones del gen de la Pfkfb3.

### Estructura exónica del gen de la Pfkfb3 humano



**Figura V.** Estructura exónica del gen de la Pfkfb3 en humano. En esta figura se puede observar que dicho gen consta de 12 exones que son constantes en todas las variantes alternativas y, de 7 exones en la denominada región variable, que son los que darán lugar a la aparición de las 6 variantes alternativas diferentes de esta isoforma.

Las ocho variantes alternativas de *R. norvegicus* se nombran desde RB2K1 a RB2K8. Las variantes alternativas RB2K3 y RB2K6 se expresan en cerebro, corazón, hígado y testículos. Las variantes alternativas RB2K2, RB2K5, RB2K7 y RB2K8 se expresan en cerebro y músculo esquelético. Por último, las variantes alternativas RB2K1 y RB2K4 se expresan exclusivamente en cerebro (Watanabe y Furuya 1999). La región carboxilo terminal varía entre estas variantes alternativas y está codificada por 7 exones diferentes (A-G). Los exones A y C son comunes a todas las variantes alternativas. El exón B es común a las variantes alternativas RB2K1, RB2K2, RB2K3 y RB2K7 y codifica un fragmento extra de 29 aminoácidos. El exón D es común a todas las variantes alternativas excepto RB2K3 y RB2K6, lo que proporciona a estas variantes alternativas un extremo carboxilo diferente al resto de variantes alternativas. El exón E sólo aparece en las variantes alternativas RB2K7 y RB2K8, lo que junto con la ausencia del exón G proporciona a estas variantes alternativas un extremo carboxilo diferente al resto de variantes alternativas. Por último, el exón F es común a RB2K1 y RB2K4, lo que hace suponer que este exón se encuentra exclusivamente en cerebro. La variante alternativa uPFK-2 (UBI2K5) se corresponde con la variante de *R. norvegicus* RB2K6 (Duran y col., 2008).



**Figura VI.** Estructura exónica del gen de las 8 variantes alternativas de la Pfkfb3 de *R. norvegicus*. En esta figura se puede observar que dicho gen consta de 12 exones que son constantes en todas las variantes alternativas, y que contiene 7 exones que darán lugar a las 8 variantes alternativas diferentes.

Especie	Variante alternativa	Cromosoma	Exones	Tamaño de transcrito (pares de bases)	Tamaño de la proteína (Aminoácidos)
<i>R. norvegicus</i>	1(RB2K1)	XVII	18	2073	555
	2(RB2K2)	XVII	17	?	543
	3(RB2K3)	XVII	16	2072	549
	4(RB2K4)	XVII	17	1986	526
	5(RB2K5)	XVII	16	?	514
	6(RB2K6) uPFK-2	XVII	15	?	520
	7(RB2K7)	XVII	17	?	542
	8(RB2K8)	XVII	16	?	513
<i>M. musculus</i>	1	I	16	4506	518
	2	I	?	?	?
	3	I	?	?	?
	4	I	?	?	?
	5	I	?	?	?
	6	I	?	?	?
<i>H. sapiens</i>	UBI2K1	X	?	?	491
	UBI2K2	X	?	?	524
	UBI2K3	X	?	?	527
	UBI2K4 (iPFK-2)	X	?	?	514
	UBI2K5 (uPFK-2)	X	?	?	521
	UBI2K6	X	?	?	462
<i>B. taurus</i>		XVI	16	3399	463

**Tabla VI.** Información genética y proteica de la isoforma Pfkfb3 en varias especies. En la tabla se puede observar cómo el gen que codifica para esta proteína se encuentra en cromosomas diferentes en función de la especie. El número de exones que codifican esta proteína oscila entre los 15 y los 17. Aparecen 6 variantes alternativas en humano, de las cuales hay dos con nombres especiales, la iPFK2 (inducible) y la uPFK2 (ubicua). En rata aparecen 8 variantes alternativas diferentes, de las cuales la RB2K6 se ha comprobado que es muy similar a la uPFK2 humana. Por último, en ratón también aparecen 6 variantes alternativas diferentes. El signo de interrogación (?) indica información desconocida ya que aún no figura en ninguna base de datos.

## 2.2. Regulación de la Pfkfb3

### 2.2.1. Regulación de la Pfkfb3 por fosforilación

Pfkfb3 se fosforila por PKA y por PKC en la Ser<sup>461</sup> sin afectar a la  $K_m$  para F6P o ATP, ni a la actividad bisfosfatásica (Tominaga y col., 1997).

En monocitos humanos activados en condiciones de hipoxia incrementa la razón AMP:ATP que activa AMPK, la cual fosforila iPFK-2 en la Ser<sup>461</sup> (Marsin y col., 2002). Esta fosforilación estimula la actividad kinásica e incrementa la concentración de F2,6P<sub>2</sub>, se estimula la glucólisis y se reestablece la concentración de ATP. La fosforilación de la iPFK-2 por la AMPK hace que incremente la velocidad máxima de la enzima 2,5 veces, sin producirse cambio alguno en la  $K_m$  para F6P y para el ATP. En experimentos similares en monocitos RAW 264.7, se comprobó que el tratamiento con oligomicina induce la fosforilación en la Thr<sup>172</sup> de la AMPK y su activación, lo que lleva a la fosforilación de la Ser<sup>461</sup> de la Pfkfb3 (Bando y col., 2005) (ver anexo 3).

La sobreexpresión de un mutante fosfomimético de Pfkfb3 Ser<sup>461</sup>→Glu<sup>461</sup> en células tumorales Cos-7 produce un descenso en las concentraciones de F2,6P<sub>2</sub> intracelular y de lactato extracelular con respecto a la forma silvestre. Además, las células que expresan la forma silvestre proliferan de un modo más rápido que las que expresan la forma mutada. Estos resultados indican que la fosforilación de la Ser<sup>461</sup> es esencial para la estimulación de la actividad kinásica de la enzima, para el incremento del flujo glucolítico y para el aumento de la proliferación celular (Bando y col., 2005). El análisis del nivel de fosforilación de la Pfkfb3 en diferentes tejidos arrojó la conclusión de que los tejidos tumorales exhiben un mayor grado de fosforilación de la Pfkfb3 que los tejidos normales (epiteliales, etc.). Además, dentro de los tejidos tumorales, se ha comprobado que las zonas con mayor grado de fosforilación son aquellas que están cercanas al tejido que está siendo invadido, lo que sugiere que la fosforilación de la Pfkfb3 está relacionada con las propiedades de invasión tumoral como son hipoxia, migración y metástasis. Por último, también se han encontrado altos

niveles de Pfkfb3 fosforilada en células del endotelio vascular y de tejido muscular liso, lo que sugiere que también puede estar implicada en angiogénesis asociada a tumores.

### *2.2.2. Regulación de la Pfkfb3 por HIF-1 $\alpha$*

HIF-1 (del inglés, hypoxic inducible factor-1) es un factor de transcripción heterodimérico formado por las subunidades HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  y, mientras que HIF-1 $\beta$  se expresa constitutivamente, HIF-1 $\alpha$  se degrada normalmente en normoxia por la vía ubiquitin-proteosoma. En respuesta a hipoxia, HIF-1 $\alpha$  se estabiliza, y el complejo HIF-1 $\alpha$ / HIF-1 $\beta$  reconoce el motivo HRE (HRE; 5'-ACGTG-3') y se activa la expresión transcripcional varios genes relacionados con la captación de glucosa y la glucólisis (Semenza 2003).

El estudio de la secuencia del promotor la Pfkfb3 (uPFK-2) en células cancerosas demostró que contiene elementos que pueden ser activados por HIF-1 $\alpha$ . Estos elementos HRE se encuentran entre los nucleótidos -1279 y -1289. En condiciones de hipoxia en estas células se produce un incremento en los niveles de RNA mensajero de Pfkfb3. Este incremento va acompañado por un aumento del flujo glucolítico y de los niveles de ATP (Minchenko y col., 2002; Obach y col., 2004).

### *2.2.3. Regulación hormonal de la Pfkfb3*

Se ha encontrado que el origen de replicación (ORF) de la progestina 1 (PRG1) contiene 520 aminoácidos con un alto grado de similitud con la Pfkfb y, especialmente, con la Pfkfb3. Cuando las células de un tumor de mama se estimulan con progestina, se incrementan los niveles de RNA mensajero de la PRG1. Debido a que la inducción de PRG1 por las progestinas resulta en un incremento de la población células en fase S se ha sugerido que PRG1 puede ejercer un control sobre la glucólisis durante el inicio de la progresión del ciclo celular (Hamilton y col., 1997).

La insulina induce la expresión del gen Pfkfb3 en células de adenocarcinoma de colon humano, lo que incrementa la concentración de F2,6P<sub>2</sub> y de lactato (Riera y col., 2002). Similares resultados se han observado tras el tratamiento de la línea celular HT29 de adenocarcinoma de colon humano con insulina y con ésteres de forbol (Denis-Pouxviel y col., 1990). Sin embargo, la vía de actuación de estos dos compuestos es diferente, ya que la activación de la Pfkfb por parte de los ésteres de forbol implica a la PKC y la actuación de la insulina no implica a esta kinasa, pero sí parece implicar a los receptores de insulina IGF-1.

### **2.3. Pfkfb3 y cáncer**

Las células tumorales mantienen un elevado flujo glucolítico, incluso en presencia de oxígeno, un fenómeno que fue descrito por primera vez por Otto Warburg en 1924 (Warburg y col., 1924; Atsumi y col., 2002). Este gran flujo glucolítico que deriva en lactato y piruvato provoca un descenso en el pH intra y extracelular que causa la apoptosis de las células colindantes no tumorales. De este modo, las células tumorales no sólo mantienen una elevada glucolisis para sus requerimientos energéticos y biosintéticos, sino que además lo utilizan para erradicar a las células normales adyacentes (Atsumi y col., 2002; Chesney 2006).

Las células tumorales proliferativas expresan constitutivamente la iPFK-2 *in vitro* y, una inhibición de esta iPFK-2, disminuye el crecimiento tumoral en modelos experimentales con animales. En particular, se ha encontrado que la expresión de la iPFK-2, está marcadamente elevada en múltiples tumores primarios agresivos como el de mama, colon, ovarios o tiroides (Atsumi y col., 2002). El incremento de los niveles de RNA mensajero de la iPFK-2 se produce durante las fases G<sub>1</sub>-S del ciclo celular, mientras que el incremento de los niveles de proteína se produce sólo en la fase S del ciclo celular. Todos estos datos sugieren que la iPFK-2 actúa como regulador esencial de la glucolisis durante la progresión del ciclo celular y el crecimiento celular en un entorno hipóxico.

La iPFK-2 se induce en monocitos activados por lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared celular de bacterias Gram-negativas que mimetiza la respuesta inflamatoria. La respuesta de los monocitos al LPS incluye la producción de citoquinas, quimioquinas, de especies reactivas del oxígeno (ROS) y de óxido nítrico (NO) (Chesney y col., 1999). La activación de los monocitos lleva al consumo de energía e implica la estimulación de la glucólisis. Bajo estas circunstancias adversas, los monocitos son capaces de sobrevivir debido a su capacidad para llevar a cabo una glucólisis anaerobia destinada a la producción de ATP.

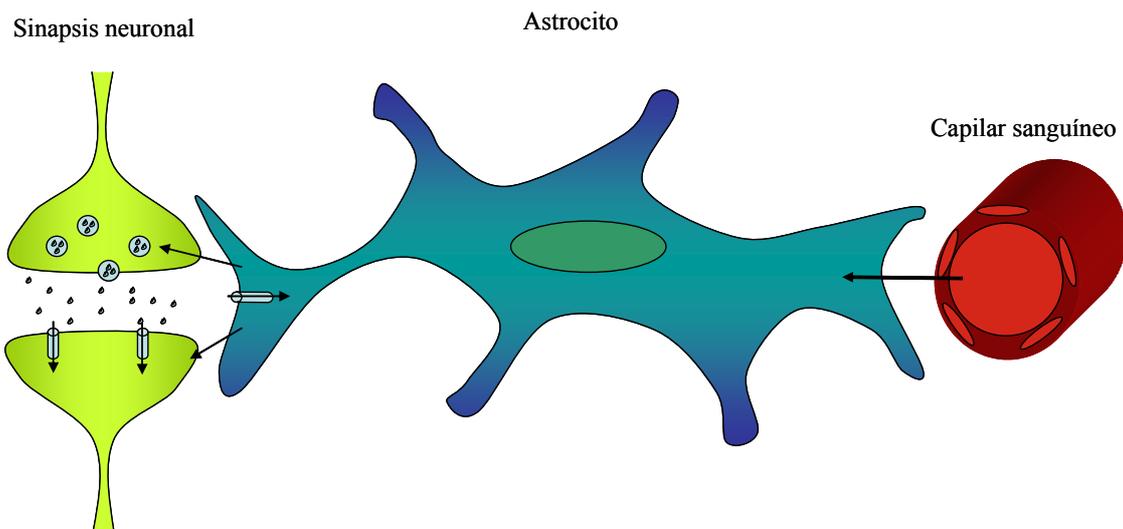
La estimulación de células hepáticas de *R. norvegicus* con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) activa la división de estas células y su desdiferenciación, y esto va acompañado por un incremento en la concentración de proteína de uPFK-2 (RB2K6). Este hecho sugiere que las células en división necesitan un alto flujo glucolítico, como ocurre en el caso de las células cancerosas (Duran y col., 2008). Por otra parte, en células HeLa, los ésteres de forbol incrementan 4 veces los niveles de RNA mensajero de la Pfkfb3 y, el AMP cíclico los incrementa 2,5 veces (Navarro-Sabate y col., 2001).

En glioma humano, la captación de glucosa y la producción de lactato están muy incrementadas en relación con los tejidos cerebrales no neoplásicos y, además, se correlacionan con el grado de malignidad del tumor (Di Chiro y col., 1982; Howe y col., 2003). Así, los niveles de RNA mensajero de Pfkfb3 de los gliomas menos malignos están incrementados con respecto a los tejidos control y a los de los gliomas muy malignos, sin embargo, los niveles de proteína de los gliomas más malignos son significativamente superiores a los observados en gliomas poco malignos y en células no neoplásicas (Kessler y col., 2007). Las diferencias entre los niveles de RNA mensajero y de proteína pueden ser debidas a una regulación de la Pfkfb3 a nivel traduccional. Todos estos resultados indican que la cantidad de proteína Pfkfb3 es un buen marcador del grado de malignidad de los gliomas.

## **2.4. Pfkfb3 en el metabolismo cerebral**

### *2.4.1. El cerebro: un tejido dependiente de glucosa*

Desde hace mucho tiempo se sabe que el cerebro es un órgano que depende del suministro de oxígeno y de sustratos energéticos. En mamíferos, la glucosa es su principal sustrato energético, que principalmente se utiliza por vía oxidativa y así genera energía en forma de ATP. La inmensa mayoría de esta energía se emplea en satisfacer la gran demanda energética necesaria para la neurotransmisión (Clarke y Sokoloff 1994). Por otro lado, no hay que olvidar la glucosa también es importante como fuente carbonada en la biosíntesis de ácidos grasos, colesterol, neurotransmisores, aminoácidos, glicerol-3-fosfato y, en astrocitos, de glucógeno (Cataldo y Broadwell 1986). Efectivamente, los astrocitos juegan un importante papel en el metabolismo energético cerebral. Así, rodean tanto los vasos sanguíneos como los espacios sinápticos en la denominada unidad neuro glio vascular, fenómeno ya observado por Camilo Golgi en 1886 (Andriezen 1893). Los astrocitos abastecen a las neuronas de sustratos metabólicos sanguíneos, principalmente glucosa (Magistretti y col., 1986; Tsacopoulos y Magistretti 1996).



**Figura VII. Esquema representativo de la unidad neuro glio vascular** (Tsacopoulos y Magistretti 1996). La estratégica localización de los astrocitos les permite desempeñar funciones esenciales de canalización de sustratos metabólicos entre la circulación sanguínea y las neuronas. Así, las prolongaciones de los astrocitos que abrazan los capilares sanguíneos (Morgello y col., 1995; Kacem y col., 1998) permiten captar los sustratos que atraviesan las células endoteliales. Por otro lado, los astrocitos presentan procesos que envuelven la sinapsis (Blumcke y col., 1995; Grosche y col., 1999), lo que les permite modular la captación de glucosa en función de la actividad sináptica.

La ruta de las pentosas fosfato constituye una importante vía de consumo de glucosa, ya que es una fuente importante de NADPH ( $H^+$ ) y ribosa-5-fosfato. Así, la oxidación de glucosa a través de esta contribuye a mantener en forma reducida el glutatión (GSH) (Baquer y col., 1988). La enzima limitante de esta vía es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y parece tener una importante función antioxidante tanto en neuronas (Ben-Yoseph y col., 1996; Garcia-Nogales y col., 2003) como en astrocitos (Garcia-Nogales y col., 1999; Kussmaul y col., 1999) en los que, tras el tratamiento con agua oxigenada, la estimulación de esta vía permite proteger a estas células frente a dicha toxicidad. Casualmente, en la enfermedad de Alzheimer (AD) se ha observado un descenso de la expresión de G6PD en hipocampo y corteza cerebral (Bigl y col., 1999) (ver anexos 4 y 5).

Es importante reseñar que la existencia de dos fases en esta vía permite un control independiente de la producción de sus dos metabolitos mayoritarios, NADPH y R5P, según las necesidades de la célula. Así, cuando el NADPH y la R5P se necesitan

en cantidades estequiométricas, la vía funciona fundamentalmente en su fase oxidativa. Por el contrario, cuando se requiere sobre todo R5P, lo hace en su fase no oxidativa. Ante una demanda mayoritaria de NADPH, la vía se lleva a cabo en su totalidad, reciclándose las pentosas fosfato formadas a G6P (Mathews y col., 2002).

#### 2.4.2. El lactato como fuente de energía en neuronas

Es sabido que el lactato constituye un excelente sustrato para las neuronas (Fernandez y Medina 1986; Vicario y col., 1991; Pellerin 2003). Es más, estudios *in vitro* han comprobado que el lactato es el sustrato preferencial de las neuronas y que el metabolismo oxidativo neuronal depende del lactato incluso en presencia de glucosa (Itoh y col., 2003). Así, la oxidación del lactato es unas diez veces superior a la oxidación de la glucosa cuando la concentración extracelular de ambos metabolitos es similar a la observada *in vivo* (Bouzier-Sore y col., 2003; Itoh y col., 2003). Estos datos se han confirmado *in vivo* (Smith y col., 2003).

Consistente con la preferente utilización de lactato por las neuronas, la isoforma predominante de lactato deshidrogenasa es la LDH1, es decir, la que tiene mayor afinidad por el lactato (Laughton y col., 2007). Además, tienen un complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) mucho más activo que los astrocitos, lo que estimula la transformación del piruvato en acetilCoA y su oxidación en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) (Itoh y col., 2003). Por tanto, en su conjunto, estos datos apoyan fuertemente la hipótesis de que las neuronas oxidan lactato eficientemente para obtener energía.

Una particularidad de las neuronas es que son incapaces de acumular glucógeno, probablemente debido a que la glucógeno sintasa neuronal se encuentra inactiva (Lafora y Glueck 1911; Vilchez y col., 2007). Es más, el glucógeno puede incluso ser tóxico para las neuronas. Así, en patologías como la enfermedad de Lafora, esta enzima se desfosforila y se activa, provocando la acumulación de glucógeno que causa la muerte de las neuronas por apoptosis (Vilchez y col., 2007). En la epilepsia mioclonal progresiva se ha observado un fenómeno similar (Cavanagh 1999).

### 2.4.3. La glucosa como fuente principal de energía en astrocitos

A diferencia de las neuronas, los astrocitos son las únicas células del sistema nervioso capaces de almacenar glucógeno en condiciones no patológicas (Wiesinger y col., 1997). De este modo, los astrocitos sirven como reservorio transitorio de glucosa. Debido a que la mayor parte de los astrocitos no expresan glucosa-6-fosfatasa (Bell y col., 1993), la G6P procedente de la degradación del glucógeno se utiliza principalmente a través de la glucólisis o de la vía de las pentosas fosfato. En efecto, la actividad sináptica neuronal estimula la degradación del glucógeno y su conversión glucolítica en lactato (Dringen y Hamprecht 1992; Dringen y col., 1993; Pellerin y Magistretti 1994). Así, este sustrato se libera al espacio intersticial donde puede ser captado por las neuronas, y utilizarlo como sustrato energético (Medina y col., 1990) (ver anexo 6).

Por otro lado, la actividad del complejo PDH es baja en astrocitos, lo que favorece la conversión del piruvato en lactato. De hecho, al incubar astrocitos en presencia de un activador de la PDH se reduce considerablemente el lactato liberado al espacio extracelular (Itoh y col., 2003).

Además del lactato, los astrocitos liberan intermediarios del TCA que pueden ser captados por las neuronas. Entre estos intermediarios se encuentra: el malato, succinato o  $\alpha$ -cetoglutarato (Shank y col., 1985; Hertz y col., 1992; Shank y Bennett 1993). Junto con la alanina que también liberan los astrocitos (Yudkoff y col., 1986), estos intermediarios se emplean por las neuronas para la síntesis de neurotransmisores como el glutamato y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Además, los astrocitos además liberan citrato, que en gran medida permanece allí para regular procesos tales como la regulación de los receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA) a través de la quelación del  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y, sobre todo,  $Zn^{2+}$  que se unen al receptor de glutamato NMDA y lo inhiben (Westergaard y col., 1995).

Por otro lado, el glutamato estimula la velocidad de la glucólisis en astrocitos (Pellerin y Magistretti 1994; Takahashi y col., 1995), cuya velocidad basal es mayor que la de las neuronas (Almeida y col., 2001; Kasischke y col., 2004). Sin embargo, la

capacidad de fosforilación oxidativa de los astrocitos es parecida a la de las neuronas (Hertz y Peng 1992; Almeida y col., 1998). Así, los astrocitos se consideraran elementos celulares implicados en el procesamiento de información del sistema nervioso (Perea y Araque 2006; Araque 2008), afirmación ya propuesta por Ramón y Cajal en 1899 (Ramón y Cajal 1899). También se conoce que los astrocitos son células excitables, que basan su excitabilidad en variaciones intracelulares en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (Haydon 2001). La excitabilidad de los astrocitos por el  $\text{Ca}^{2+}$  puede ocurrir espontáneamente (Parri y col., 2001) o puede ser generada por distintos estímulos, entre los que se encuentran los neurotransmisores liberados por las neuronas (Perea y Araque 2006).

#### *2.4.4. Los oligodendrocitos: una célula consumidora de glucosa y lactato*

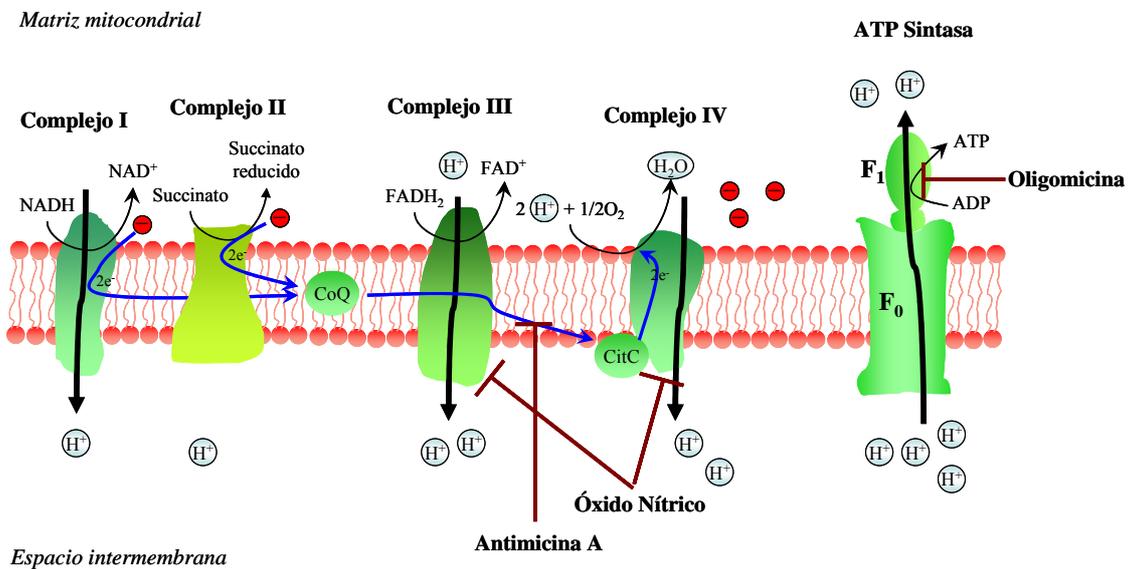
Los oligodendrocitos en cultivo utilizan mayor cantidad de glucosa y tienen una fosforilación oxidativa superior a la de los astrocitos (Edmond 1992; Sanchez-Abarca y col., 2001). Probablemente, los oligodendrocitos no expresen piruvato carboxilasa, ya que la actividad de esta enzima no se encuentra en las bandas de mielina que rodean a los axones (Shank y col., 1985). Además, estas células utilizan lactato como fuente de energía y como precursor de lípidos, y su flujo de glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato es, al menos, dos veces mayor que en neuronas y astrocitos (Sanchez-Abarca y col., 2001).

### **2.5. Regulación diferencial de la glucólisis en neuronas y astrocitos**

En condiciones normales, el grado de acoplamiento mitocondrial de los astrocitos es muy similar al de las neuronas (Almeida y col., 1998). Sin embargo, al incubarse ambos tipos celulares con cantidades idénticas de óxido nítrico, inhibidor de la citocromo *c* oxidasa (Bolanos y col., 1994), los astrocitos son capaces de mantener constantes los niveles de ATP a lo largo del tiempo, mientras que en neuronas la concentración de ATP descendiende progresivamente (Almeida y col., 2001).

Es más, el descenso en la concentración de ATP neuronal se acompaña de un colapso del potencial de membrana interna mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) (Brorson y col., 1999; Almeida y col., 2001), pero los astrocitos muestran una pequeña hiperpolarización de la membrana interna mitocondrial. La explicación del aumento en el  $\Delta\psi_m$  en astrocitos reside en el aumento de la velocidad de la glucólisis. Así, el ATP generado en la glucólisis se hidroliza por la ATPasa contribuyendo al mantenimiento de la carga eléctrica negativa en la matriz mitocondrial (Akerman y Jarvisalo 1980; Buchet y Godinot 1998; Almeida y col., 2001).

Por lo tanto, la fuerte reactivación de la glucólisis en los astrocitos supone un importante mecanismo de defensa frente a un daño mitocondrial. Por este motivo, nuestro grupo de investigación se ha interesado en estudiar el mecanismo responsable de este fenómeno. Así, el tratamiento con óxido nítrico activa rápidamente (en minutos) la PFK-1 en astrocitos (Almeida y col., 2004). Investigando el mecanismo de la rápida activación de la PFK-1 por óxido nítrico se observó que el aumento de la concentración de F2,6P<sub>2</sub> precedía la activación de la PFK-1, sugiriendo la implicación de la Pfkfb en el efecto (Almeida y col., 2004).



**Figura VIII. Cadena transportadora de electrones y algunos de sus inhibidores.** Como se puede observar, la oligomicina inhibe a la ATP sintasa, el óxido nítrico inhibe los complejos III y IV y la antimicina A inhibe el transporte de electrones desde el coenzima Q hacia el citocromo C.

En efecto, la expresión de la isoforma cerebral de la Pfkfb (Pfkfb3) es profusa en astrocitos, pero negligible en neuronas (Almeida y col., 2004). Es más, el silenciamiento de la Pfkfb3 mediante siRNA previno la activación glucolítica causada por el óxido nítrico en astrocitos. Finalmente, estos estudios también concluyeron que la activación de la Pfkfb3 por óxido nítrico estaba mediada por la proteína kinasa dependiente del AMP (AMPK) (Almeida y col., 2004).

El papel de la regulación de la PFK-1 en supervivencia celular se ha demostrado en otros sistemas. Así, en pacientes postmortem de AD se ha observado un gran descenso en la actividad de la PFK1 (Bowen y col., 1979; Iwangoff y col., 1980). Sorprendentemente, en estudios posteriores se mostró que la actividad de la PFK1 aumentaba en pacientes de AD (Bigl y col., 1996), aunque dicho incremento se correlacionaba con un aumento de la población de astrocitos en las áreas estudiadas. Estos estudios sugieren la existencia de dos procesos en AD: la reducción del metabolismo neuronal y la compensación del mismo por un incremento en la actividad glial (Bigl y col., 1999). Por otra parte, en la enfermedad de Huntington (HD) se ha observado un descenso de la actividad glucolítica en las áreas afectadas, debido fundamentalmente al descenso de la actividad glucolítica de los astrocitos (Powers y col., 2007).



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



*“Para un auténtico investigador, cada proyecto debería ser un nuevo comienzo en el que él intenta algo que está más allá de su alcance”*

**Ernest Hemingway**



Resultados previos de nuestro laboratorio sugieren que la elevada capacidad glucolítica de los astrocitos es esencial para promover su propia supervivencia celular, en especial frente a un daño mitocondrial. La 6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (Pfkfb), enzima encargada de sintetizar fructosa-2,6-bisfosfato (el efector alostérico de la 6-fosfofructo-1-kinasa), parece jugar un importante papel en el mencionado efecto. Es bien conocido que las neuronas, sin embargo, son incapaces de estimular su propia glucolisis para promover supervivencia frente a una crisis bioenergética mitocondrial. A la vista de ello, nos hemos planteado como hipótesis principal de esta Memoria la posibilidad de que la glucolisis neuronal está sujeta a un férreo control, probablemente por la Pfkfb, lo que apuntaría a esta enzima glucolítica como una posible diana molecular en neuroprotección.

Para desarrollar esta hipótesis nos hemos propuesto desarrollar los siguientes objetivos:

1. Estudiar la expresión, a nivel de RNA mensajero y de proteína, de la Pfkfb en neuronas y en astrocitos. Identificar las isoformas, y posibles variantes alternativas mayoritarias del RNA mensajero, de la Pfkfb3 en estas células. Con este objetivo pretendemos caracterizar el patrón de expresión de la Pfkfb en estos dos tipos de células neurales.
2. Dilucidar si la baja expresión de la Pfkfb en neuronas determina la escasa capacidad glucolítica de estas células. De ser así, nos propondríamos investigar el mecanismo molecular responsable de la escasa expresión de la Pfkfb en neuronas. Con este objetivo pretendemos esclarecer si la Pfkfb controla la glucolisis neuronal.
3. Investigar si la expresión de Pfkfb en neuronas proporciona una elevada capacidad glucolítica y, en su caso, protección frente a un daño mitocondrial. Con este objetivo pretendemos esclarecer si la Pfkfb podría ser una posible diana molecular a considerar en neuroprotección.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



**3**



## **1. Especie ensayada, condiciones del animalario y control de la edad gestacional**

Empleamos ratas albinas de raza Wistar, criadas y suministradas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales se criaron en jaulas y se mantuvo un ritmo de luz-oscuridad de 12 horas, con la fase de oscuridad entre las 20:00 y las 8:00 horas del día siguiente. La humedad osciló entre el 45 % y el 65 % y la temperatura entre los 20 °C y los 25 °C. Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta sólida estándar (17 % de proteínas, 3 % de lípidos, 58,7 % de glúcidos, 4,3 % de celulosa, 5 % de minerales y 12 % de humedad) y tuvieron en todo momento acceso libre al agua de bebida.

La edad gestacional de la rata se controló limitándose a una noche el tiempo de cohabitación de las ratas vírgenes con los machos. A las 9:00 horas de la mañana siguiente se separaron aquellas que presentaban espermatozoides en el frotis vaginal, acompañados de células epiteliales de la vagina características del día fértil del estro. Bajo estas condiciones, el periodo de gestación de la rata se asume que es de 21,7 días.

Todos los tratamientos con animales cumplen con la normativa vigente de la comisión europea del 18.06.2007 (2007/526/CE) y la legislación española (RD 1201/2005) sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Los protocolos fueron aprobados por el Comité ético para la Experimentación Animal y Humana del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL).

## **2. Preparación de los cultivos celulares**

### **2.1. Cultivo primario de neuronas**

Para la realización del cultivo primario de neuronas se emplearon fetos de rata de 16 días de gestación (Almeida y col., 1998). Para ello, las gestantes previamente anestesiadas en atmósfera de éter etílico, se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los fetos tras una rápida histerectomía. Los fetos se trasladaron a una cabina de flujo laminar (TC48, Gelaire Flow Laboratories, McLean, Virginia, EEUU) para garantizar las condiciones de esterilidad del cultivo. Con la ayuda de tijeras, pinzas y papel impregnado en etanol al 70 %, se retiró el cráneo y se extrajeron los hemisferios cerebrales.

El tejido así obtenido se depositó sobre una placa Petri de poliestireno que contenía la solución de disgregación (NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,01 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,5mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, glucosa 4 mM, rojo fenol 10 mg/mL, albúmina 0,3 % p/v y DNAsa tipo I 20 µg/mL a pH 7,2) y, empleando un bisturí, se disgregó parcialmente y se dejó decantar en un tubo de 50 mL (BD, Falcon, Bedford, Massachussets, EEUU) durante 4 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en la solución de tripsinización (solución de disgregación suplementada con tripsina al 0,025 %, p/v) y se incubó a 37 °C durante 15 minutos, en un baño agitando suavemente cada 2-3 minutos para facilitar la tripsinización. Transcurrido este tiempo, la digestión se detuvo añadiendo suero fetal de ternera (FCS; Roche Diagnostics, Heidelberg, Alemania) a una concentración final del 10 % v/v y el tejido se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos (Beckman Instruments, Palo Alto, California, EEUU).

El sedimento resultante se resuspendió en 12 mL de la solución de disgregación y, para conseguir su disociación, se hizo pasar 9 veces a través de una pipeta Pasteur previamente siliconada. Tras dejar reposar la solución celular durante 4 minutos, se recogió cuidadosamente el sobrenadante conteniendo las células disociadas en un tubo de 50 mL. Este proceso se realizó otra vez para incrementar la eficiencia. Se

combinaron los sobrenadantes así obtenidos y las células disociadas se centrifugaron de nuevo a 500 x g durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió primero en 1 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma-Aldrich Chemical Co., Barcelona, España) y, a continuación, en 20 mL de DMEM, y una pequeña alícuota de esta suspensión celular (10 µL) se diluyó cuatro veces y se mezcló con un volumen igual de azul de tripano (Sigma-Aldrich) al 0,4 % para el recuento celular, empleando para ello una cámara cuentaglóbulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y un microscopio de contraste de fases, modelo CK30 (Olympus, Japón).

Una vez determinado el número de células, la suspensión se diluyó en el medio de cultivo (DMEM suplementado con FCS al 10 %) y se sembraron a una densidad de 250.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo (Nunc; Roskilde, Dinamarca) previamente recubiertas con poli-D-lisina (10 µg/mL; Sigma-Aldrich). Las placas se colocaron en un incubador termostático a 37 °C (Thermo Forma 310, Thermo-Fisher Scientific, Ohio, EEUU) con una atmósfera saturada de vapor de agua, compuesta por un 95 % de aire y un 5 % de CO<sub>2</sub>.

A los dos días de cultivo, el medio se cambió por DMEM suplementado con suero de caballo (Sigma-Aldrich) al 5 % v/v, glucosa 20 mM (Sigma-Aldrich). Al cuarto día de cultivo se añadió arabinósido de citosina 10 µM (Sigma-Aldrich) para impedir la proliferación de células no neuronales. Las células se utilizaron a los 6-7 días de cultivo. Bajo estas condiciones, los cultivos de neuronas mostraron una pureza aproximada del 97-99 %, determinada mediante inmunorreacción con el marcador neuronal Map-2 (Almeida y col., 2005).

Todos los medios de cultivo se suplementaron con penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y anfotericina B (0,25 µg/mL) suministrados por Sigma-Aldrich.

## **2.2. Cultivo primario de astrocitos**

Para la realización del cultivo de astrocitos se utilizaron neonatos de rata de 0 a 24 horas de vida postnatal (Almeida y col., 1998). Los animales se limpiaron con etanol al 70 %, se decapitaron y se les extrajo el cerebro completo en la cabina de flujo laminar. Con la ayuda de unas pinzas, se eliminaron el cerebelo y el bulbo, y los hemisferios cerebrales se limpiaron de meninges y vasos sanguíneos. El tejido resultante se depositó en una placa Petri que contenía la solución de disgregación. La obtención de la solución celular se realizó del mismo modo que en el cultivo de neuronas.

La suspensión celular se sembró a una densidad aproximada de 25.000 células/cm<sup>2</sup> en DMEM suplementado con FCS al 10 % en frascos de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> (BD, Falcon). Las células se mantuvieron en un incubador termostatzado a 37 °C, con una atmósfera saturada de vapor de agua, compuesta por un 95 % de aire y un 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se renovó dos veces por semana. Tras dos semanas de incubación en estas condiciones, el cultivo presentó una pureza aproximada del 90-95 %, determinada mediante inmunorreacción con el anticuerpo anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein; Sigma-Aldrich).

## **2.3. Cultivo de HEK293-T**

La línea celular procedente de riñón embrionario humano 293T (HEK293T) se mantuvo en crecimiento en DMEM suplementado con FCS al 10 %. 24 horas antes de su utilización, las células se sembraron a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de poliestireno recubiertas con Poli-D-Lisina 10 µg/mL (Sigma-Aldrich).

### **3. Construcción de plásmidos**

Para las transformaciones bacterianas se utilizaron células competentes de *E. coli*, cepa DH-5 $\alpha$ , preparadas en nuestro laboratorio a partir de un *stock* donado por el Instituto de Microbiología-Bioquímica de Salamanca (IMB). Los medios de cultivo de bacterias (LB, LB-agar y 2 x YT) se prepararon con bactotripton, extracto de levadura y agar procedentes de DIFCO Laboratories (Detroit, Michigan, EEUU).

La extracción y purificación de los plásmidos tras su amplificación en bacterias se llevó a cabo utilizando el sistema Wizard Plus Midipreps, de la casa Promega (Madison, Wisconsin, EEUU). Para aislar y purificar el cDNA de los geles de agarosa se empleó un kit comercial de Gibco BRL (Life Technologies Inc., Barcelona, España).

#### **3.1. RNA de interferencia**

##### *3.1.1. Diseño de los “small hairpin RNA” (shRNA)*

El silenciamiento de Cdh1, de la ciclina B1 y de Pfkfb3 se realizó mediante la expresión de los correspondientes shRNA. Para ello, se utilizó el vector de expresión pSuper-neo/gfp (Oligoengine, Seattle, Washington, EEUU) que, al expresar en paralelo el shRNA y la proteína verde fluorescente (GFP), permitió la identificación y seguimiento de las neuronas transfectadas. Los oligonucleótidos utilizados para Cdh1, CiclinaB1 y Pfkfb3 fueron los ya descritos (Brummelkamp y col., 2002; Almeida y col., 2004; Almeida y col., 2005). Como control se utilizó un shRNA frente a la luciferasa (Ohtsuka y col., 2004).

Proteína	Número de acceso	Secuencia	Posición
Cdh1	NM_016263	5'-TGAGAAGTCTCCCAGTCAG-3'	235-253
Ciclina B1	AY338491	5'-GATGGAGCTGATCCAAACC-3'	478-496
Pfkfb3	NM_057135	5'-AAAGCCTCGCATCAACAGC-3'	1908-1926
Luciferasa		5'-CTGACGCGGAATACTTCGA-3'	

**TABLA I. Secuencias empeladas para los experimentos de RNA de interferencia mediante expresión de shRNA.**

A partir de las secuencias seleccionadas, se diseñaron unos oligonucleótidos de 64 pares de bases (Isogen, Barcelona, España), de forma que, al ser expresados en la célula a partir del vector, se genera una estructura en horquilla (shRNA) con las secuencias sentido y antisentido de la región seleccionada. Esta estructura es reconocida por la enzima Dicer, que rompe la horquilla y produce los RNA pequeños de interferencia (siRNA) funcionales, que se unen a la secuencia correspondiente del RNA mensajero y conduce a su degradación por el complejo RISC. Si la especificidad de la secuencia del siRNA no es completa (presenta alguna base desapareada), el mecanismo de acción consiste en prevenir la traducción debido a la presencia de fragmentos del mensajero que tienen doble cadena, lo cual paraliza la acción de los ribosomas y la síntesis de proteína a partir de dicho mensajero, sin degradar el RNA mensajero. En la siguiente figura se puede observar el mecanismo de funcionamiento de los shRNAs.

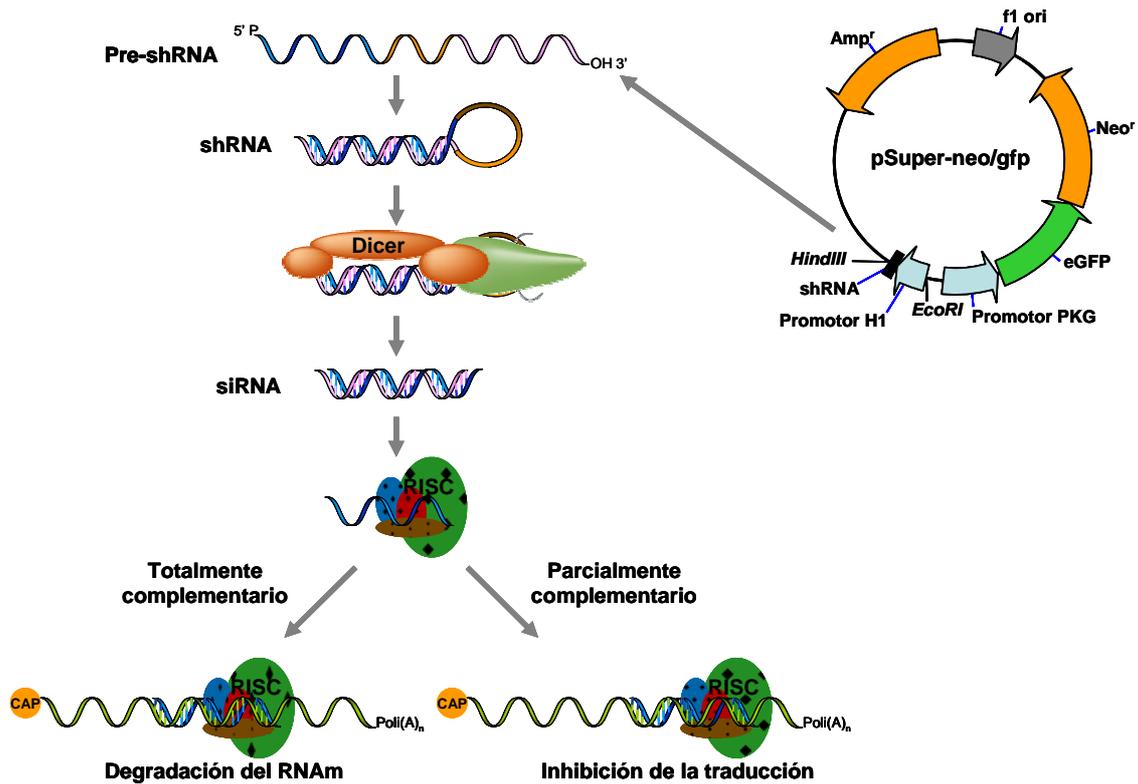


FIGURA I. Esquema del vector pSuper-neo/gfp y mecanismo de acción de los shRNA.

### 3.1.2. Diseño de los “small interfering RNA” (siRNA)

Con el fin de reducir los niveles de expresión de las proteínas fosfogluco isomerasa (PGI) y Cdh1 decidimos empelar siRNAs. En esta memoria hemos empleado siRNA suministrados por Dharmacon Research Inc. (Lafayette, Colorado, EEUU), frente PGI y Cdh1. Los oligonucleótidos empleados se diseñaron en base a los criterios de diseño racional de Reynolds y *col.* (Reynolds y *col.*, 2004), y de Ui-Tei y *col.* (Ui-Tei y *col.*, 2004), que se citan en la tabla II.

Criterios de Reynolds	Criterios de Ui-Tei
1. Contenido en GC 30-52 %	1. A/U en la posición 19 de la cadena antisentido
2. Al menos 3 A/U en posición 15-19 de la cadena sentido	2. G/C en la posición 19 de la cadena sentido
3. Ausencia de repeticiones internas	3. Riqueza en AU en el extremo 5' de la cadena antisentido
4. A en posición 19 de la cadena sentido	4. Ausencia de secuencias GC de más de 9 pares de bases
5. A en posición 3 de la cadena sentido	
6. U en posición 10 de la cadena sentido	
7. Ninguna G/C en posición 19 de la cadena sentido	
8. Ninguna G en posición 3 de la cadena sentido	

**TABLA II. Criterios racionales de Reynolds y Ui-Tei para el diseño optimizado de secuencias-diana en experimentos de RNAi.**

La especificidad de las secuencias seleccionadas se confirmó mediante BLAST frente al genoma completo de rata y humano. Siguiendo estos criterios se diseñaron dos oligonucleótidos para PGI. Para Cdh1 se utilizó un oligonucleótido ya utilizado por otros autores (Brummelkamp y col., 2002) y como control se utilizó un siRNA contra la luciferasa (Ohtsuka y col., 2004). Los siRNA se usaron a una concentración de 100 nM, aunque se realizaron experimentos previos en los que se utilizaron concentraciones que oscilaron entre los 20 y los 100 nM, demostrándose que la concentración más efectiva fue 100 nM. Las transfecciones con los siRNA se realizaron 3 días antes de la realización del experimento, puesto que en experimentos preliminares comprobamos máxima eficacia tras este periodo. Los siRNAs diseñados son los mostrados en la tabla III.

Proteína	Número de acceso	Secuencia	Posición
Cdh1	NM_016263	5'-TGAGAAGTCTCCCAGTCAG-3'	235-253
PGI	NM_207192	5'-GCAAAGCTATCACGGACAT-3'	503-521
PGI*	NM_207192	5'-CCTTACCAGACGTAGTGTT -3'	1248-1266
Luciferasa		5'-CTGACGCGGAATACTTCGA-3'	

**TABLA III. Secuencias empleadas para los experimentos de RNAi mediante expresión de siRNA.** \* Secuencia que resultó tener más eficacia.

### 3.2. Sobreexpresión de proteínas

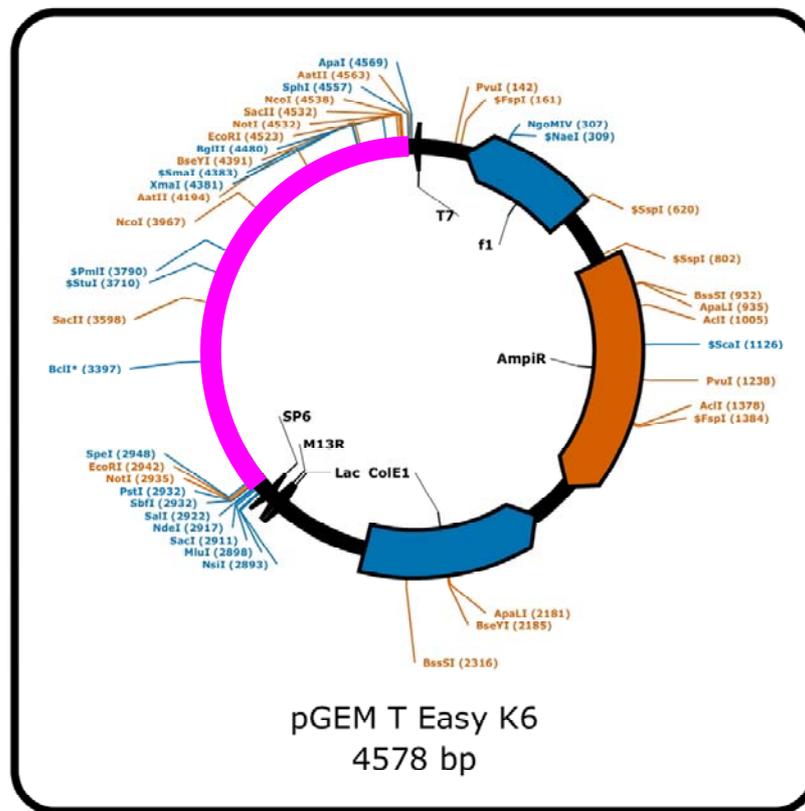
#### 3.2.1. Sobreexpresión de las variantes alternativas RB2K3 y RB2K6 de Pfkfb3

Los cDNA (DNA complementario) que codifican estas dos variantes alternativas de la Pfkfb3 (RB2K3 1650 pares de bases, número de Swiss-Prot O35552-3 y RB2K6 1563 pares de bases, número de Swiss-Prot O35552-6) se obtuvieron mediante RT-PCR a partir de RNA total de astrocitos de rata. La RT-PCR se realizó en dos pasos, según las condiciones expuestas en la tabla IV. Primero se realizó la transcripción reversa para la generación de los cDNA molde (Reverse Transcription System, Promega Biotech Ibérica, Madrid, España) y, posteriormente, se amplificó el fragmento de cDNA mediante PCR en un termociclador (Mastercycler egradient S, Eppendorf Iberica, San Sebastián de los Reyes, Madrid, España). Los fragmentos obtenidos, de 1563 y 1650 pares de bases, respectivamente, se clonaron en el vector de expresión pGEM®-T Easy (Promega). Este vector se encuentra linearizado y deja dos timinas desapareadas. Debido a que la en la amplificación por PCR con *Taq* polimerasa ésta añade deoxiadenosina al extremo 3' de una gran proporción de los fragmentos de la PCR, éstos pueden ser ligados en el vector pGEM®-T Easy. Del mismo modo se clonaron en este vector los dominios bisfosfatasa de ambas variantes alternativas (915 pares de bases para RB2K3 y 828 pares de bases para RB2K6) y el dominio kinasa (735 pares de bases en ambas variantes alternativas).

Inserto	Tamaño (bp)	Oligo sentido (5'→3')	Oligos antisentido (5'→3')
RB2K3 Completa	1650	GTCGCCGAATACAGCAA CGAAGATG	GAACCCCTACTTCAGCATCAGTG
RB2K6 Completa	1563		
Dominio Kinasa	735	GTCGCCGAATACAGCAA CGAAGATG	TCCGGGGGAAATCCGGCTACTGC ACGTGGATGTTCA
Dominio Bisfosfatasa RB2K3	915	CCCCGGACCATCTACCTG TGT	GAACCCCTACTTCAGCATCAGTG
Dominio Bisfosfatasa RB2K6	828		

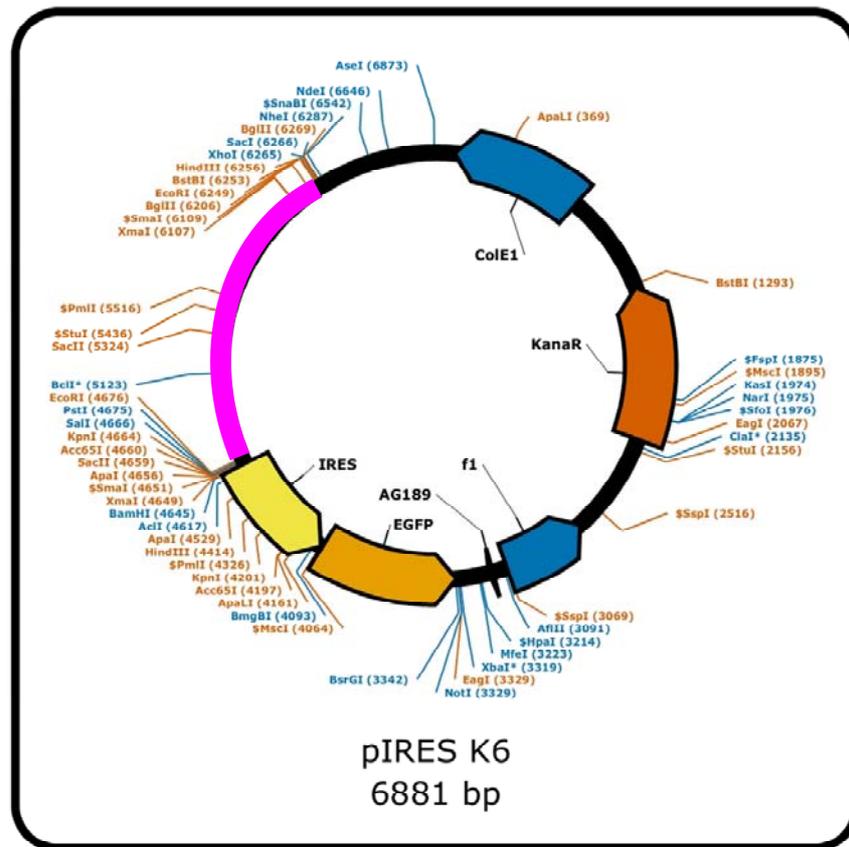
**TABLA IV. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de las variantes alternativas RB2K3 y RB2K6, así como de sus dominios bisfosfatasa y kinasa para su clonación en pGEM®-T Easy.** Las condiciones de la RT-PCR fueron 50' a 48 °C para la transcripción reversa, seguida de 10' a 94 °C, 35 ciclos de 1' a 94 °C, 1' a 59,7 °C y 2' a 68 °C y, finalmente, un último paso de extensión de 10' a 68 °C.

De este modo se obtuvieron 5 vectores como el que se muestra en la figura II.



**FIGURA II.** Vector pGEM®-T Easy con la variante alternativa RB2K6 insertada entre los sitios de clonación múltiple (en rosa).

A continuación, los vectores pGEM®-T Easy que contenían las distintas construcciones y el vector de expresión pIRES2.eGFP (Clontech, Mountain View, California, EEUU) se incubaron con *EcoRI* durante 1 hora con objeto de dejar los extremos cohesivos y así facilitar su posterior ligación e inserción. De este modo obtuvimos 5 vectores diferentes que denominamos: pIRES K3, pIRES K6, pIRES Kinasa, pIRES Bisfosfatasa K3 y pIRES bisfosfatasa K6. La expresión de la proteína verde de este vector permite la identificación de las células transfectadas por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Los vectores obtenidos fueron como el que se muestra en la figura III.



**FIGURA III.** Vector pIRES2.eGFP con la variante alternativa RB2K6 insertada en el sitio *EcoRI* (en rosa).

### 3.2.2. Sobreexpresión de *Cdh1*

El cDNA de *Cdh1* se obtuvo mediante la digestión del plásmido pCDNA (generosamente cedido por el Dr. J. Pines) con *EcoRI*. A continuación el cDNA de *Cdh1* se insertó en el vector de expresión pIRES2.eGFP previamente digerido con *EcoRI*. El plásmido obtenido se denominó pIRES *Cdh1* (Almeida y col., 2005).

### 3.2.3. Sobreexpresión de G6PD

El cDNA completo que codifica la G6PD de rata se insertó en el sitio *EcoRI* del vector de expresión pEGFP (Clontech) y se secuenció (Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca) para comprobar que correcta inserción en fase de lectura con la proteína verde fluorescente (GFP) (Garcia-Nogales y col., 2003).

### 3.3. Mutagénesis dirigida

Con objeto de mutar la caja KEN de Pfkfb3 a AAA se utilizó el sistema QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, California, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una PCR de la construcción pIRES K6 utilizando los oligonucleótidos que contenían la secuencia modificada (Tabla V). A continuación, el producto de la PCR se incubó con la enzima de restricción *DpnI*, que reconoce exclusivamente el DNA metilado, esto es, el producto *in vivo*, pero no el producto de la PCR que carece de metilaciones.

La presencia de las mutaciones de los plásmidos resultantes se confirmó mediante secuenciación (Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca) y comparación con la secuencia original de RB2K6.

	Oligo (5'→3')	Condiciones PCR
Oligo sentido	ATCCTTCATTTTGCCGCAGCAGCTGACTTCAAGGC	1' a 95 °C
Oligo antisentido	ATGCCTTGAAGTCAGCTGCTGCGGCAAATGAAGG	50s a 95°C 50s a 55 °C 7' a 68°C 10' a 68 °C

**TABLA V. Oligonucleótidos empleados para la mutagénesis de K6.** En esta tabla se muestran los oligonucleótidos utilizados para la mutar la secuencia KEN en la posición 142 de la secuencia de aminoácidos a AAA. Los nucleótidos mutados se encuentran subrayados.

## **4. Transfección transitoria de células en cultivo**

Las transfecciones celulares se realizaron con el reactivo catiónico Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Madrid), siguiendo las instrucciones del fabricante. La eficiencia de la transfección se calculó mediante la cuantificación de las células fluorescentes (GFP<sup>+</sup>) por microscopía de fluorescencia (Leica Microsystems Wetzlar GMBH, Wetzlar, Alemania), que resultó ser de aproximadamente un 5-10 % en las neuronas, un 20 % en los astrocitos, un 50-70 % en SH-SY5Y y un 80-95 % en HEK293-T. La correcta traducción de los plásmidos en sus respectivas proteínas se comprobó por transferencia tipo Western, y la funcionalidad de las mismas se realizó mediante la determinación de los sustratos y productos.

## **5 Tratamiento de las células**

### **5.1. Inhibición de la cadena transportadora de electrones**

Tras 24 horas de transfección con el plásmido correspondiente, las células se incubaron en DMEM que contenía el donador de óxido nítrico (Z)-1-[2-(2-aminoetil)-N-(2-aminoetil) amino]-1-diazonio-1,2-diolato (DETA-NO; Alexis Corporation, San Diego, California, EEUU) a una concentración final de 0,5 mM a 37 °C durante 1-8 horas. Este donador libera constantemente óxido nítrico al medio de incubación, de manera que una solución de DETA-NO 0,5 mM generó en el medio una concentración del radical de 1,4 µM, a 37 °C durante 20 horas, determinada con un electrodo sensible al óxido nítrico (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, EEUU) (Almeida y col., 2001). Con objeto de estabilizar la producción de óxido nítrico y asegurar la inmediata exposición de las células al radical, el DETA-NO se preincubó en el DMEM a 37 °C durante 30 minutos, antes de añadirlo a las células.

También se utilizó la antimicina A (Sigma-Aldrich) como inhibidor de la cadena transportadora de electrones. 24 horas después de la transfección con el plásmido correspondiente, las células se incubaron en DMEM con antimicina A 5  $\mu\text{M}$  a 37 °C entre 30 minutos y 4 horas.

## 5.2. Inhibición del proteosoma

Con objeto de inhibir la actividad del proteosoma se utilizaron dos inhibidores: MG-132 y lactacistina (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemania). Ambos inhibidores se utilizaron a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y se añadieron en el día 6 del cultivo *in vitro* de neuronas, y las células se recolectaron 30 minutos después.

## 5.3. Inhibición de caspasas

Como inhibidores de caspasas se utilizaron Z-VAD-fmk, Z-DEVD-fmk, Z-IETD-fmk, Z-VDVAD-fmk y Z-LEHD-fmk (Calbiochem). Estos inhibidores se utilizaron a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , ya que previamente nuestro laboratorio ha demostrado su eficiencia a esta concentración (Diaz-Hernandez y col., 2007), y se añadieron al cultivo 6 horas después de las transfecciones. En la tabla VI se muestra la caspasa inhibida por cada uno de estos compuestos.

Inhibidor	Caspasa(s) inhibida
Z-VAD-fmk	Todas las caspasas
Z-DEVD-fmk	Todas las caspasas
Z-VDVAD-fmk	Caspasa 2
Z-LEHD-fmk	Caspasa 9
Z-IETD-fmk	Caspasa 8

**TABLA VI. Inhibidores de caspasas y la(s) caspasa(s) sobre la que ejercen su inhibición.**

## **6. Generación de un anticuerpo contra las variantes alternativas RB2K3 y RB2K6 de la Pfkfb3**

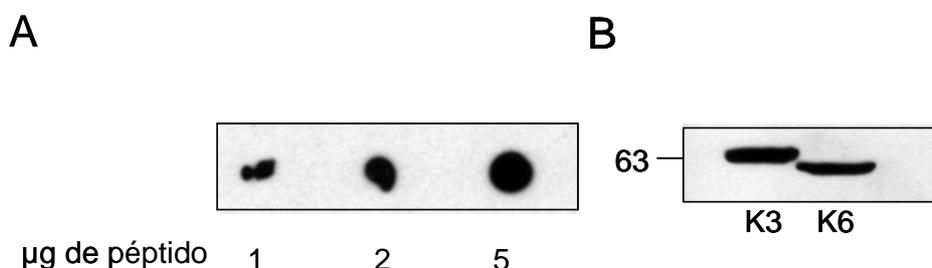
Debido a la ausencia de un anticuerpo comercial que reconociera exclusivamente estas dos variantes alternativas de la Pfkfb3, decidimos generarlo en nuestro laboratorio siguiendo la técnica descrita por Sambrook y Russell (Sambrook y Russel 2001).

Se seleccionó un fragmento de polipéptido que fuera común a estas dos variantes alternativas y que no se encontrara en ninguna de las otras 6 variantes alternativas (Tabla VII). Este polipéptido se unió a KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin; Calbiochem) mediante un residuo de cisteína. Estas soluciones se emulsionaron con el adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) y se inyectaron intradérmicamente en la espalda afeitada de los conejos. A las cuatro semanas, se realizó una segunda inmunización con la emulsión del polipéptido unido a KLH y el adyuvante incompleto de Freund en los alrededores de los ganglios poplíteos. Estas dosis de recuerdo se repitieron cada 4 ó 5 semanas durante 6 meses.

Las extracciones de sangre (50 mL) se realizaron repetidamente dos semanas después de cada una de las dosis de recuerdo, a través de la vena marginal de la oreja del conejo. Tras aislar el suero, el anticuerpo se purificó mediante cromatografía de afinidad con una columna de CNBr-Sepharosa (GE Healthcare BioSciences AB, Uppsala, Suecia), que contenía el antígeno unido a la matriz. La especificidad del anticuerpo se comprobó mediante Dot-Blot y transferencia tipo Western.

Variante alternativa	Secuencia
	501 <span style="float: right;">550</span>
RB2K1	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQPLLKGKACLRTVCHIFSKFSPY
RB2K2	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQPLLKGKACLT
RB2K3	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQN <b>MRSPRSGAESSQKH</b>
RB2K4	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQPLLKGKACLRTVCHIFSKFSPY
RB2K5	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQPLLKGKACLT
RB2K6	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQN <b>MRSPRSGAESSQKH</b>
RB2K7	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQPLLKGKACL
RB2K8	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQPLLKGKACL

**TABLA VII. Extremo carboxilo de la secuencia de aminoácidos de las 8 variantes alternativas de Pfkfb3.** En rojo se encuentra subrayada la secuencia contra la que se diseñó el anticuerpo que, como se puede comprobar, es común a las variantes alternativas RB2K3 y RB2K6, pero no aparece en ninguna de las otras 6 variantes alternativas.



**FIGURA IV. Verificación del correcto funcionamiento del anticuerpo anti Pfkfb3.** (A) Dot blot frente a concentraciones crecientes del péptido MRSPRSGAESSQKHC contra el cual fue diseñado el anticuerpo. (B) Western blot realizado en extractos de células 293-T en las cuales se sobreexpresaron las variantes alternativas RB2K3 y RB2K6, demostrándose la especificidad de este anticuerpo.

## 7. Cuantificación cualitativa de RNAm mediante RT-PCR (Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa)

El RNA utilizado como molde se extrajo utilizando el GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), a partir de RNA total de neuronas y astrocitos. La obtención del cDNA completo se realizó mediante la reacción de transcripción reversa seguido de amplificación del DNA (RT-PCR) en un único paso (Access RT-PCR System, Promega) utilizando un termociclador (Mastercycler egradient S, Eppendorf). Los oligonucleótidos empleados fueron suministrados por Thermo Scientific (Ulm, Alemania). Para la identificación de las distintas isoformas de la Pfkfb expresadas en neuronas y astrocitos los oligonucleótidos utilizados son los que se muestran en la tabla VIII.

Isoforma	Número de acceso	Oligo sentido (5'→3')	Oligo antisentido (5'→3')
Pfkfb1	NM_012621	CAGATGAGCTGCCCTATCTCA AGT (oligo 1)	AGGTAGGGCACTCTCAGGCCAT AG (oligo 2)
Pfkfb2	NM_080477	CGTCCTCGTTATCTCTCACC (oligo 3)	CCCAAACACTGTAATTTCTTGGA C (oligo 4)
Pfkfb3	NM_057135	CCAGCCTCTTGACCCTGATAA ATG (oligo 5)	TCCACACGCGGAGGTCCTTCAG AT (oligo 6)
Pfkfb4	NM_019333	ACCACTACCCGCTGGAGTTTG (oligo 7)	GTCTGTCTCGGTGTGTGTTCA (oligo 8)

**TABLA VIII. Oligonucleótidos empleados en la identificación de las diferentes isoformas de la Pfkfb en neuronas y astrocitos.** Las condiciones de la RT-PCR fueron 50' a 48 °C para la transcripción reversa, seguida de 10' a 94 °C, 35 ciclos de 1' a 94 °C, 1' a 58 °C y 30'' a 68 °C y, finalmente, un último paso de extensión de 10' a 68 °C.

Los oligonucleótidos empleados para identificar las distintas variantes alternativas (Watanabe y col., 1997) de la isoforma Pfkfb3 en neuronas y astrocitos se muestran en la tabla IX.

Variantes alternativas reconocidas	Oligo sentido (5'→3')	Oligo antisentido (5'→3')
RB2K1, K2, K3, K4, K5 y K6	CTAGCCTACTTCCTTGACAAG (oligo 9)	GAACCCCTACTTCAGCATCAGTG (oligo 10)
RB2K1 y K4	CTAGCCTACTTCCTTGACAAG (oligo 11)	GTGACAGACAGTTCGTAGACAGG (oligo 12)
RB2K7 y K8	CTAGCCTACTTCCTTGACAAG (oligo 13)	GGAGACCAAAGGGCCAACAAGC (oligo 14)
Fragmento de 29 aminoácidos	GACCTCCTCTTACACCGAACTT (oligo 15)	

**TABLA IX. Oligonucleótidos empleados en la identificación de las diferentes variantes alternativas de la Pfkfb3 en neuronas y astrocitos.** Las condiciones de la RT-PCR fueron 50' a 48 °C para la transcripción reversa, seguida de 10' a 94 °C, 35 ciclos de 1' a 94 °C, 45'' a 56,8 °C y 45'' a 68 °C y, finalmente, un último paso de extensión de 10' a 68 °C.

## 8. Electroforesis e inmunodetección de proteínas (Western Blot)

Para obtener los extractos proteicos totales, las células se lavaron con PBS y se lisaron en tampón de lisis, compuesto por RIPA (SDS al 1 %, EDTA 0,5 M, Triton Tx-100 al 1 % v/v, NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM a pH 7,0) al que se le añaden inhibidores de proteasas y fosfatasa (aprotinina 50 µg/mL, leupeptina 50 µg/mL, inhibidor de tripsina (soybean) 50 µg/mL, TLCK 100 µM, NaF 50 mM, ortovanadato sódico 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 µM, N-p-tosil-L-fenilamina clorometil cetona (TPCK) 100 µM, fenantrolina 1 mM y pepstatina A 50 µg/mL). Los extractos se hirvieron durante 5 minutos, se centrifugaron a 13.000 x g

durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó mediante el sistema BCA (Pierce, Rockwell, Illinois, EEUU).

Las proteínas (40 µg aprox.) de los extractos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (solución de acrilamida/bisacrilamida 29/1; BioRad Laboratories S.A., Alcobendas, Madrid) al 8 %, con un marcador de peso molecular de proteínas (Benchmark<sup>TM</sup>, Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU), utilizando un sistema de electroforesis vertical (MiniProtean-3®, BioRad Laboratories, California, EEUU). Posteriormente, las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Hybond®, Amersham Biosciences) que, tras la transferencia, se bloquearon con leche al 5 % p/v en TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 al 0,1 % v/v a pH 7,5), durante 1 hora. Las membranas se incubaron en la solución de anticuerpos (TTBS suplementado con BSA al 2 % p/v) que contenía el anticuerpo deseado (Ver tabla X) a 4 °C durante toda la noche. Para tener un control de carga, las mismas membranas se incubaron en presencia del anticuerpo anti-GAPDH (1/40.000; Ambion, Austin, Texas, EEUU). Tras lavar 3 veces con TTBS, las membranas se incubaron en TTBS con BSA al 2 % en presencia del anticuerpo secundario deseado (Ver tabla X) conjugado con la peroxidasa de rábano a 25 °C durante 45 minutos.

Finalmente, las membranas se incubaron con el reactivo de quimioluminiscencia SuperSignal<sup>TM</sup> West Dura (Pierce) y se expusieron a una película Kodak XAR-5 (Sigma-Aldrich). Una vez reveladas, las autorradiografías se digitalizaron para cuantificar la intensidad de las bandas, utilizando un software para el tratamiento de imágenes (NIH Image, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EEUU). Los valores se expresaron como razón frente a la intensidad de la banda de GAPDH.

Proteína	Anticuerpo 1°	Dilución 1°	Anticuerpo 2°	Dilución 2°
Pfkfb3	Generado en nuestro laboratorio	1/2000	Anti IgG de conejo; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EEUU	1/20000
Pfkfb3	PFK-2 brain/placental (L-13) sc-10091; Santa Cruz Biotechnology	1/1000	Anti IgG de cabra; Santa Cruz Biotechnology	1/10000
Pfkfb1/4	Pfk2 liv (E-16) Santa Cruz Biotechnology	1/1000	Anti IgG de cabra; Santa Cruz Biotechnology	1/10000
Pfkfb2	C. MacKintosh, University of Dundee, RU	1/1000	Anti IgG de oveja; Santa Cruz Biotechnology	1/4000
PGI	PGI Santa Cruz Biotechnology	1/500	Anti IgG de cabra; Santa Cruz Biotechnology	1/10000
G6PD	J.M. Bautista, Universidad Complutense, Madrid, España	1/500	Anti IgG de conejo; Santa Cruz Biotechnology	1/20000
Cdh1	AR38, J. Gannon, Clare Hall Laboratories, Cancer Research, RU	1/15	Anti IgG de ratón; Pierce	1/1000
GAP43	GAP 43 ab7462, Abcam plc., Cambridge, RU	2 µg/mL	Anti IgG de conejo; Santa Cruz Biotechnology	1/20000
GFAP	GFAP, G-9269, Sigma-Aldrich	1/500	Anti IgG de ratón; Pierce	1/1000
Map2	MAP2, ab11267, Abcam plc.	1/500	Anti IgG de ratón; Pierce	1/1000
AMPK	Grahame Hardie, University of Dundee, RU	1/1000	Anti IgG de oveja; Promega	1/10000

**TABLA X. Anticuerpos utilizados en esta Memoria en transferecias tipo Western.** En la tabla se muestra el anticuerpo primario utilizado, la casa comercial a la que pertenece y la dilución a la que se utilizó. Por último, también se muestra la dilución a la que se utilizaron los anticuerpos secundarios.

## **9. Inmunoprecipitación**

Los extractos de proteínas totales de neuronas tratados con los inhibidores del proteosoma se obtuvieron del mismo modo que para la transferencia tipo Western. Sobre 1 mg de proteína se añadieron 30  $\mu$ L de proteína sefarosa A (0,12g/mL; GE Healthcare) y el anticuerpo anti-Pfkfb3 a una dilución 1/100 y se incubaron toda la noche a 4 °C en agitación. A continuación las muestras se centrifugaron y se realizaron 3 lavados con RIPA y un lavado con agua fría. Por último, se centrifugaron de nuevo las muestras y el precipitado se resuspendió en tampón de carga para la realización de la transferencia tipo Western.

Después de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con el anticuerpo anti-ubiquitina a una dilución 1/1000 (Cell Signalling, Boston, Massachussets, EEUU ) y se incubaron toda la noche a 4 °C en agitación. Tras lavar 3 veces con TTBS, las membranas se incubaron en TTBS con BSA al 2 % en presencia del anticuerpo secundario anti IgG de ratón (Pierce) a una concentración 1/1000 conjugado con la peroxidasa de rábano a 25 °C durante 45 minutos. Finalmente, las membranas se incubaron con el reactivo de quimioluminiscencia SuperSignal™ West Dura (Pierce) y se expusieron a una película Kodak XAR-5 (Sigma-Aldrich).

## **10. Electroforesis y detección del RNAm (Northern Blot)**

El RNA total se extrajo de las células mediante el kit Geneute™ Mammalian Total RNA Kit (Sigma-Aldrich) y su concentración se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm. La integridad del RNA extraído se comprobó mediante la observación, en un gel de agarosa al 0,8 % con bromuro de etidio, de las dos bandas correspondientes a los RNA ribosómicos de 28 S y 18 S. Las muestras (15  $\mu$ g) de RNA total se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v con formaldehído (Sambrook y Russel 2001). Posteriormente, el RNA se transfirió a una membrana de nylon GeneScreen Plus (NEN Life Sci., Boston, Massachussets, EEUU) y

se fijó a la membrana mediante radiación ultravioleta (UVC 500, Hoefer, San Francisco, California, EEUU). Las membranas se hibridaron a 65 °C durante 18 horas, en presencia de las correspondientes sondas de cDNA marcadas radiactivamente mediante “random priming” con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (20  $\mu$ Ci, Amersham) y se expusieron a una película autorradiográfica (Kodak XAR-5, Sigma-Aldrich). Como sonda de cDNA se utilizó el dominio kinasa de la Pfkfb3 (735 bp), obtenida mediante PCR a partir del vector pIRES Kinasa. Como marcador de la cantidad de RNA cargado, se utilizó el cDNA de un fragmento de ciclofilina de rata, generosamente cedido por Dionisio Martín-Zanca (Universidad de Salamanca). Las autorradiografías se digitalizaron y se cuantificó la intensidad de las bandas, utilizando el software NIH Image 1.63. Los valores se expresaron como razón frente a la intensidad de la banda de ciclofilina.

## **11. Inmunohistoquímica**

Las ratas Wistar se anestesiaron profundamente con una mezcla (3:4) de hidrocloreuro de ketamina (Ketolar, Parke-Davis, Barcelona, España) e hidrocloreuro de tiacina (Rompún, Bayer, Leverkusen, Alemania), usando 1 mL de la mezcla por cada kg de peso. A continuación el animal se perfundió intra-aórticamente con NaCl al 0,9 % seguido de la solución fijadora de Somogy sin glutaraldehído (5 mL/g por gramo de peso). Después de la perfusión, los cerebros se disociaron y post fijaron en la misma solución fijadora durante 24 horas a 4 °C. Seguidamente, los bloques de cerebro se lavaron durante dos horas en tampón fosfato 0,1 M (TF) a pH 7,4 y se sumergieron en sacarosa al 30 % en TF p/v hasta que se hundieron. Después de la crioprotección, se obtuvieron secciones de 30  $\mu$ m de espesor con un microtomo de deslizamiento en congelación (Leica Frigomobil, Jung SM 2000, Leica, Nussloch, Alemania).

Las secciones se recolectaron en azida de sodio 0,05 % en TF p/v a 4 °C. A continuación, las secciones se lavaron en TF 0,1 M pH 7,4 3 veces cada una durante 10 minutos, y después se incubaron secuencialmente en:

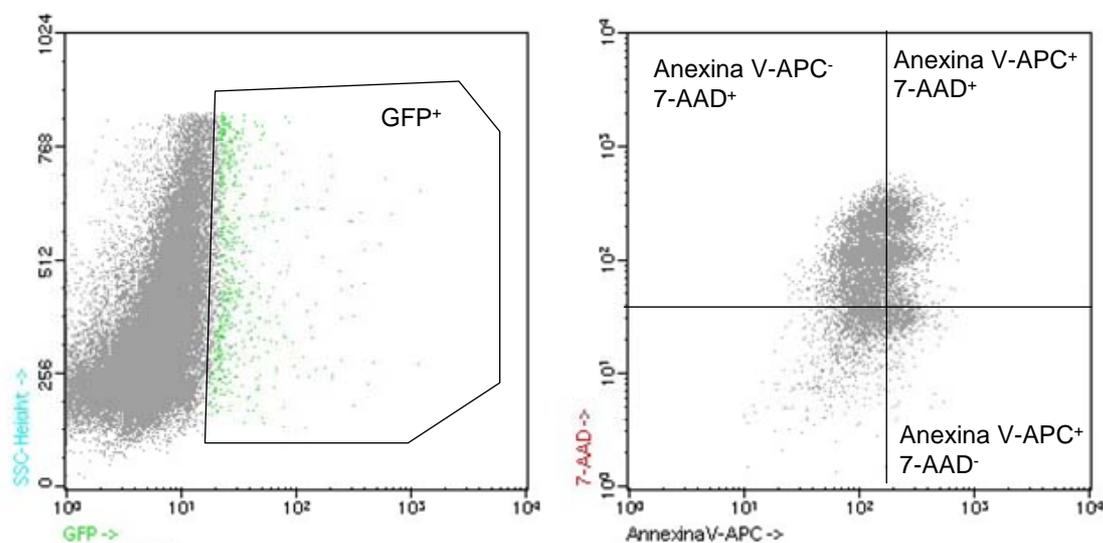
1. Borohidruro de sodio al 1 % durante 20 minutos para eliminar la autofluorescencia producida por los aldehídos
2. Triton X-100 al 2 % y suero de burro al 5 % en TF durante 1 hora a temperatura ambiente
3. Anti-Pfkfb3 (Br/pl Santa Cruz Biotechnology, sc10091) 1/100, anti-NeuN (No. MAB377, Chemicon International, Temecula, California, EEUU) 1/5000, anti-GFAP (No.G-3893, Sigma) 1/1000. Todos ellos incubados en Triton X-100 al 2 % y suero de burro al 5 % en TF durante 72 horas a 4 °C.
4. DAPI 0,1 µg/mL en PB durante 10 minutos a temperatura ambiente
5. Anticuerpo Cy2 anti-cabra hecho en burro 1/400, anticuerpo Cy3 anti-ratón hecho en burro 1/400 en TF durante 2 horas a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos secundarios proceden de Jackson ImmunoResearch (Pennsylvania, EEUU)

Entre cada uno de estos pasos, las secciones se lavaron cuidadosamente con TF tres veces durante 10 minutos. Después del último lavado las secciones se montaron en un medio para conservar la fluorescencia. A continuación las secciones se observaron y fotografiaron primero en un microscopio de fluorescencia (Provis AX70, Olympus, Tokio, Japón) y después en un microscopio confocal (TCS SP2, Leica, Mannheim, Alemania) (Valero y col., 2005).

## **12. Cuantificación de apoptosis mediante tinción con anexina y 7-amino-actinomicina D**

La muerte celular por apoptosis se determinó, mediante citometría de flujo, tras teñir las células con anexina V, conjugada con APC, y 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences). El método se basa en la detección de la fosfatidilserina, que en las células apoptóticas se transloca del interior al exterior de la membrana plasmática. La anexina V es una proteína anticoagulante vascular que posee una gran afinidad por la fosfatidilserina. Por ello, unido a un fluorocromo adecuado, permite la identificación de

las células apoptóticas tras su unión a la fosfatidilserina localizada en la superficie celular. Sin embargo, la anexina V también es capaz de unirse a la fosfatidilserina en el interior de aquellas células que no tienen intacta su membrana plasmática (consideradas como necróticas). Por ello, junto con la anexina V se utilizó un colorante que se une específicamente al DNA de las células necróticas, el 7-AAD, para así poder identificar exclusivamente las células apoptóticas. Así, sólo aquellas células inmunorreactivas para la anexina V, que mostraron ser negativas para el 7-AAD, se consideraron apoptóticas.

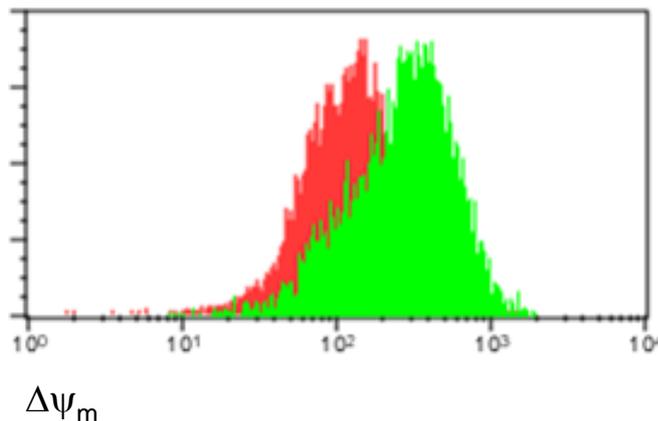


**FIGURA V. Determinación de la muerte celular por apoptosis.** De la población total de células se seleccionaron solamente aquellas que presentaban fluorescencia verde (GFP<sup>+</sup>) y, dentro de esta población, se analizó la tinción con Anexina V-APC y con 7-AAD, considerándose apoptóticas aquellas que son Anexina V-APC positivas y 7-AAD negativas.

Tras la transfección de las células con el plásmido adecuado, se tripsinizaron suavemente y se incubaron con la anexina V-APC y el 7-AAD, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 15 minutos de incubación, las señales de la GFP, de la anexina V-APC y del 7-AAD se analizaron en los canales FL1, FL4 y FL3, respectivamente, de un citómetro de flujo FACScalibur (BD, Biosciences), equipado con luz láser de argón 15 mW sintonizado a 488 nm, utilizando los programas CellQuest<sup>TM</sup> PRO y Paint-A-Gate<sup>TM</sup> PRO (BD Biosciences). De las células GFP<sup>+</sup>, se consideraron apoptóticas las que eran anexina V-APC<sup>+</sup> y 7AAD<sup>-</sup>.

### 13. Medida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )

El potencial de membrana mitocondrial se determinó mediante citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del sistema comercial MitoProbe™ DiIC<sub>1</sub> (5) Assay Kit for Flow Cytometry (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Holanda). Así, las neuronas transfectadas con los plásmidos correspondientes se tiñeron con MitoProbe™ DiIC<sub>1</sub> (5), que, dado su carácter catiónico, se acumula en las mitocondrias polarizadas, por lo que su pérdida es un índice de despolarización mitocondrial. Los valores del  $\Delta\psi_m$  se expresaron como porcentajes, y se utilizó una mezcla de oligomicina y antimicina (Sigma-Aldrich) como desacoplador de la mitocondria para definir el 0 % de  $\Delta\psi_m$ . Las señales de la GFP y el fluorocromo se analizaron en los canales FL1 y FL4, respectivamente, del citómetro de flujo FACScalibur.



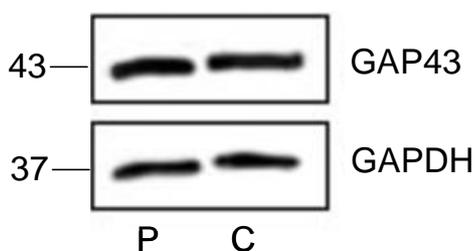
**FIGURA VI. Determinación del potencial de membrana mitocondrial.** La diferencia de  $\Delta\psi_m$  entre las muestras marcadas sólo con DiIC<sub>1</sub> (5) (verde) y aquellas que además se trataron con una mezcla de antimicina y oligomicina (rojo) nos da idea del grado de despolarización mitocondrial sufrido por las neuronas.

### 14. Separación de poblaciones celulares mediante “Cell Sorting”

Las neuronas se transfectaron con los plásmidos adecuados y, a los tiempos indicados, se separaron de las placas de cultivo cuidadosamente utilizando 1 mM de EDTA tetrasódico en PBS. A continuación, la suspensión neuronal se centrifugó durante 5 minutos a 500 x g y el precipitado se resuspendió en PBS. La separación

celular (cell sorting) fue llevada a cabo en un citómetro de flujo FACScalibur (BD, Biosciences). La separación de las poblaciones celulares se basó en la expresión de la proteína verde fluorescente GFP o de la tinción anexina-APC/7-AAD. La pureza de la población separada fue del  $98 \% \pm 1,6 \%$ .

Para comprobar que las neuronas no sufrieron daño axonal durante el despegue de las placas, se realizó una transferencia de Western empleando el marcador axonal GAP43. Como muestra la figura VII, las neuronas recolectadas del citómetro expresaron GAP 43 con la misma intensidad que las que fueron lisadas directamente en la placa.



**FIGURA VII. Expresión de GAP43.** Esta figura muestra la expresión del marcador axonal GAP43 en neuronas separadas por citometría de flujo (C) y en neuronas se lisaron en placa (P).

## 15. Detección de especies reactivas del oxígeno (ROS)

La detección de las ROS fue llevada a cabo utilizando los métodos de la dihidroetidina (Molecular Probes, Eugene, Oregón, EEUU) y del MitoSox-Red<sup>TM</sup> (Invitrogen). Para el primero, las neuronas se incubaron en PBS que contenía dihidroetidina  $10 \mu\text{M}$  a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  en oscuridad durante 45 minutos. El exceso de dihidroetidina se eliminó, y el producto oxidado, etidio, se determinó por microscopía de fluorescencia (510-560 nm). Para el MitoSox-Red<sup>TM</sup>, las neuronas se incubaron con MitoSox-Red<sup>TM</sup>  $2 \mu\text{M}$  durante 30 minutos. A continuación se lavaron y la fluorescencia se determinó en el citómetro de flujo FACScalibur. El MitoSox-Red<sup>TM</sup> es un marcador flourogénico que se une selectivamente al anión superóxido en la mitocondria de las

células vivas. Cuando el MitoSox-Red<sup>TM</sup> se oxida por el superóxido exhibe fluorescencia roja.

## **16. Determinación de la concentración de metabolitos**

### **16.1. Determinación de la concentración de D-glucosa, D-glucosa-6-fosfato (G6P), D-fructosa-6-fosfato (F6P) y D-fructosa-1,6-bisfosfato (F1,6P<sub>2</sub>) y L-lactato**

La concentración de estos metabolitos fue determinada en extractos neutralizados de ácido perclórico obtenidos de aproximadamente 15 millones de células. Las células se lavaron con PBS y a continuación se añadió en las placas 1 mL de ácido perclórico 0.6 M. Las células se recogieron y, tras centrifugar el lisado, el sobrenadante se neutralizó con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 M.

#### *16.1.1. Determinación de la concentración de D-glucosa*

Se realizó una determinación espectrofotométrica midiendo el incremento de absorbancia a los 10 minutos, a 340 nm, del NADPH(H<sup>+</sup>) producido en las reacciones consecutivas catalizadas por la hexokinasa y la G6PD (Roche diagnostics Corporation, Mannheim, Alemania) (Bergmeyer y col., 1974). La mezcla de reacción consistió en:

Tampón Tris-HCl 38.5 mM pH 8

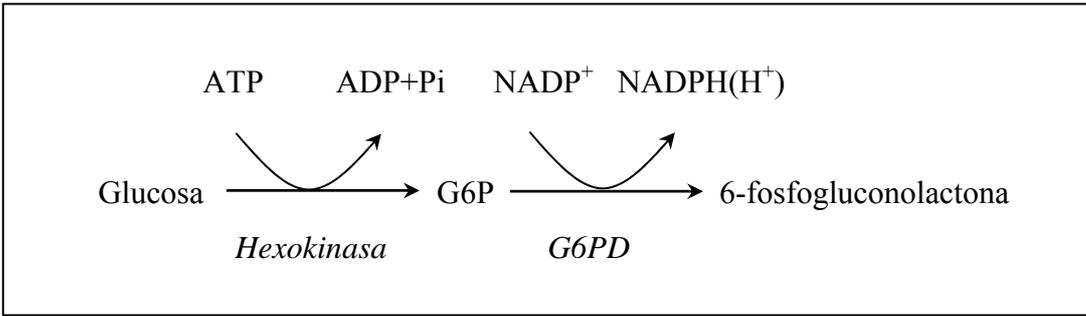
MgCl<sub>2</sub> 3.8 mM

NADP<sup>+</sup> 0.38 mM

ATP 0.38 mM

G6PD 1 U/mL

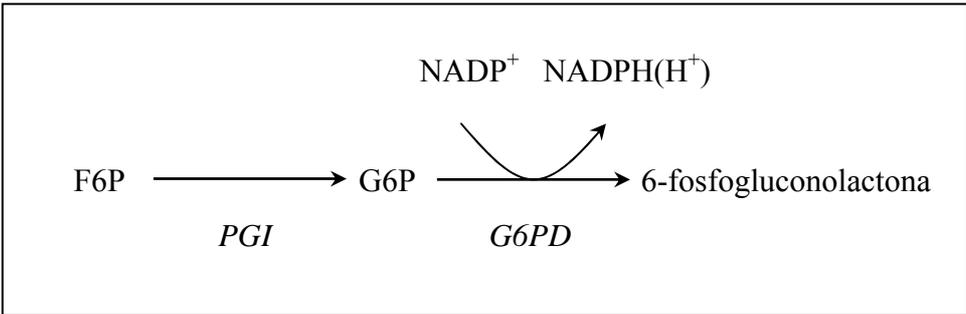
Hexokinasa 2 U/mL



*16.1.2. Determinación de la concentración de G6P y F6P*

Se realizó una determinación espectrofotométrica midiendo el incremento de absorbancia, a 340 nm, del NADPH(H<sup>+</sup>) producido en dos reacciones consecutivas, la catalizada por la G6PD, y la catalizada por la PGI (Roche), según el método descrito por Michal (1985) (Michal 1985a). La mezcla de reacción consistió en:

- Tampón trietanolamina 0,2 M pH 7.6
- MgCl<sub>2</sub> 5 mM
- NADP<sup>+</sup> 0,2 mM
- G6PD 0,17 U/mL
- PGI 0,7 U/mL



*16.1.3. Determinación de la concentración de F1,6P<sub>2</sub>*

Se realizó una determinación espectrofotométrica midiendo el descenso de absorbancia, a 340 nM, del NAD<sup>+</sup> producido en tres reacciones consecutivas, la catalizada por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Roche), la catalizada por la triosa fosfato isomerasa (TIM; Sigma-Aldrich) y la catalizada por la aldolasa (Roche) según el método descrito por Michal (1985) (Michal 1985b). La mezcla de reacción consistió en:

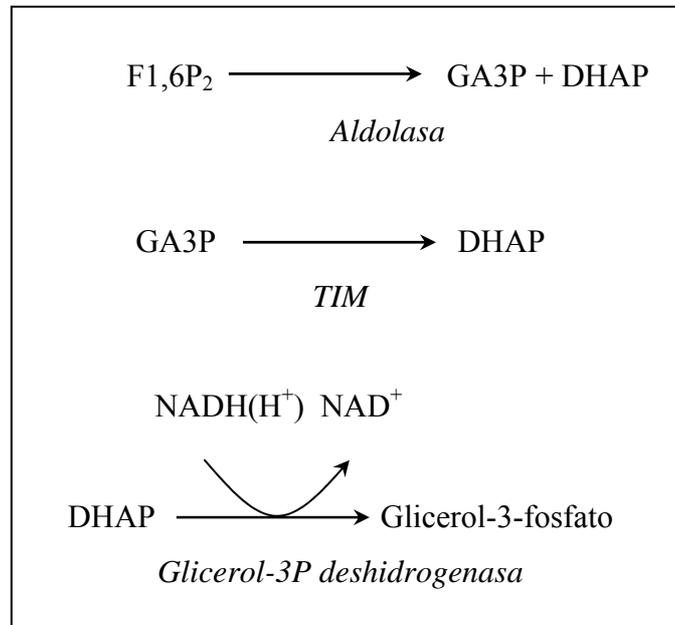
Tampón trietanolamina/EDTA 0,2 mM/20 mM pH 7.6

NADH(H<sup>+</sup>) 0,017 mM

Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 0,13 U/mL

TIM 0,83 U/mL

Aldolasa 0,04 U/mL



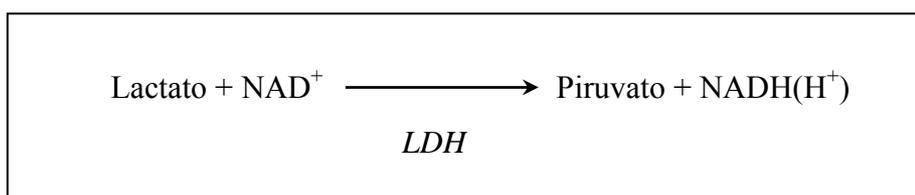
#### 16.1.4. Determinación de la concentración de L-lactato

Se realizó una determinación espectrofotométrica por el método de Gutmann y Wahlefeld, midiendo el incremento de absorbancia a los 40 minutos, a 340 nm, del NADH(H<sup>+</sup>) producido en la reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH; Roche) (Gutmann y Wahlefeld 1974). La mezcla de reacción consistió en:

Tampón glicina/hidrazina/EDTA 250 mM/500 mM/ 1 mM pH 9.5

NAD<sup>+</sup> 1 mM

LDH 22,5 U/mL

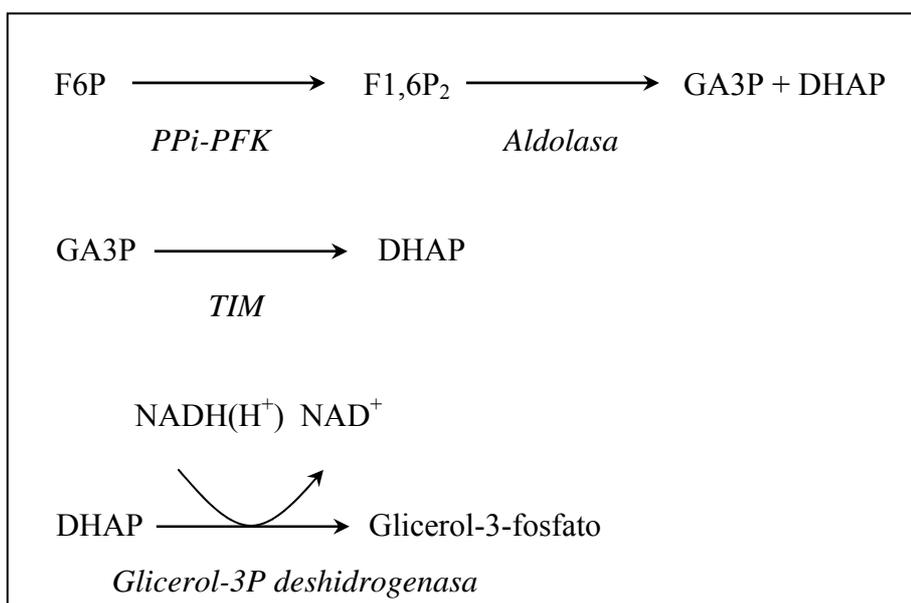


## 16.2. Determinación de la concentración de fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6P<sub>2</sub>)

Los extractos celulares se lisaron con NaOH 0,1 N y se centrifugaron a 4 °C a 20.000 x g durante 20 minutos. Una alícuota del homogenado se usó para determinar proteínas y, el resto, se calentó a 80 °C durante 5 minutos y se volvió a centrifugar durante 20 minutos a 4 °C a 20.000 x g. El sobrenadante resultante se utilizó para la determinación de F2,6P<sub>2</sub>.

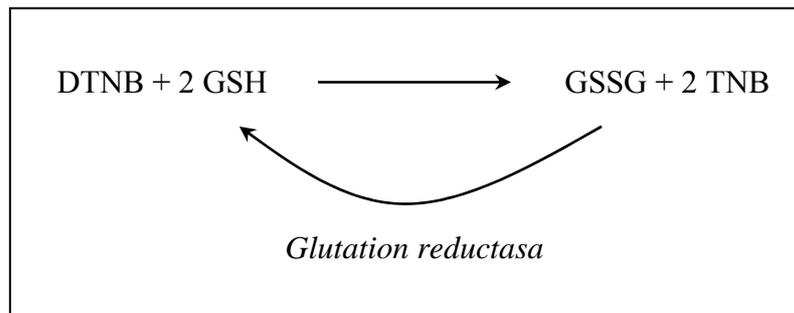
La F2,6P<sub>2</sub> se determinó espectrofotométricamente midiendo el descenso de absorbancia, a 340 nm, del NAD<sup>+</sup> cada minuto durante 10 minutos en cuatro reacciones consecutivas, la catalizada por la fosfofructokinasa pirofosfato (PPi-PFK; Sigma-Aldrich), la catalizada por la aldolasa, la catalizada por la TIM y la catalizada por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa según el método de Van Schaftingen (Van Schaftingen y col., 1982b). La mezcla de reacción consistió en:

Tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8  
MgCl<sub>2</sub> 5 mM  
F6P 2 mM  
NADH(H<sup>+</sup>) 0,3 mM  
Aldolasa 0,45 U/mL  
TIM 5 U/mL  
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 1,7 U/mL  
PPi-PFK 0,01 U/mL



### 16.3. Determinación de la concentración de glutatión

Para la determinación de glutatión, las células separadas por citometría de flujo se recolectaron rápidamente en 0,5 mL de ácido sulfosalicílico al 1% p/v, se centrifugaron a 13000 x g durante 5 minutos y cada sobrenadante se recogió para determinar el contenido de glutatión total ( $\text{GSx} = \text{GSH} + 2\text{GSSG}$ ), según el método descrito por Tietze (Tietze 1969). Este método se basa en la oxidación del GSH a expensas del DTNB (5,5'-ditio-bis-ácido 2-nitrobenzoico) (Sigma-Aldrich) el cual se reduce a TNB según la siguiente reacción:



Para esta determinación, se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo plano, en las que se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra y 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción que consistió en:

- EDTA 1 mM
- DTNB 0,3 mM (Sigma-Aldrich)
- NADPH 0,4 mM (Sigma-Aldrich)
- 1 U/mL de glutatión reductasa (Sigma-Aldrich)
- Tampón fosfato sódico 0,1 mM, pH 7,5

El GSSG se cuantificó tras la derivatización de las muestras de GSH con 2-vinilpiridina (Sigma-Aldrich). Los incrementos de absorbancia se monitorizaron en un espectrofotómetro de placas (Multiskan Ascent, Termo Electron Corp, Basingstoke, Reino Unido) a 405 nm, a intervalos de 15 segundos, durante 2,5 minutos. Para el cálculo de las concentraciones de glutatión, se realizó paralelamente una recta patrón a

partir de soluciones estándar de GSSG de concentraciones entre 0 y 50 mM. La concentración de GSx se calculó a partir de las pendientes obtenidas en las muestras, extrapolándolas a las obtenidas con la recta patrón.

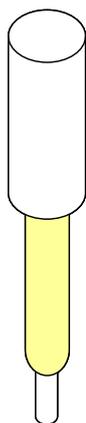
## **17. Determinación del flujo glucolítico**

El flujo glucolítico se determinó por dos métodos diferentes: la conversión de [6-<sup>14</sup>C]-glucosa a [<sup>14</sup>C]-lactato y la producción de <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O a partir de [3-<sup>3</sup>H]-glucosa. En ambos casos se utilizaron células procedentes del citómetro de flujo (10-20.000 células), que se incubaron en Erlenmeyer sellados que contenían el tampón Krebs-Henseleit (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11 mM, NaCl 122 mM, KCl 3.1mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM y CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM a pH 7.4) suplementado con D-glucosa 5 mM y con 1 μCi de [6-<sup>14</sup>C]-glucosa (Amersham) o 5 μCi de [3-<sup>3</sup>H]-glucosa (Perkin Elmer, Boston, Massachussets, EEUU) en una atmósfera saturada de oxígeno para permitir el metabolismo oxidativo. La incubación se realizó a 37 °C durante 90 minutos en agitación, tras los cuales las reacciones se detuvieron con NaOH 0.06 M (para las determinaciones de <sup>14</sup>C-lactato) o con HClO<sub>4</sub> al 3 % v/v (para la determinación de <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O). En experimentos preliminares (no mostrados) se demostró la linealidad del proceso con respecto al tiempo, al menos hasta los 90 minutos.

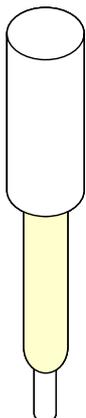
### **17.1. Grado de conversión de [6-<sup>14</sup>C]-glucosa a [<sup>14</sup>C]-lactato**

Para cuantificar el <sup>14</sup>C-lactato, los extractos celulares fueron neutralizados con ZnSO<sub>4</sub> al 1 % p/v, se centrifugaron a 16.000 x g y 0.5 mL del sobrenadante se hicieron pasar por dos columnas en tándem colocadas del siguiente modo (Hammerstedt 1973; Huang y Veech 1982):

Columna Dowex  
AG 1x8 de ácido  
fórmico (BioRad  
laboratories)



Columna Dowex  
AG 1x8 de ácido  
bórico (BioRad  
laboratories)



1. Sobre estas dos columnas colocadas en tándem se añadieron los 500  $\mu$ L de suspensión celular y a continuación se añadieron 10 mL de agua.
2. Se separaron las columnas
3. Sobre ambas columnas (por separado) se añadieron 8 mL de ácido fórmico 4 N y se recogieron 8 fracciones de 1 mL.
4. De estas fracciones de 1 mL se depositaron 0,5 mL en tubos de centelleo, sobre los que se añadieron 5 mL de líquido de centelleo (UniverSol™, ICN Biomedicals Inc., Irvine, California, EEUU), y se determinó su radiactividad en un contador de centelleo (LS 6500, Beckman Coulter, Fullerton, California, EEUU).
5. La radiactividad debida al  $^{14}\text{C}$ -lactato apareció entre las fracciones 2 y 4 de las muestras procedentes de la columna de ácido fórmico
6. La radiactividad debida al  $^{14}\text{C}$ -glucosa apareció entre las fracciones 3 y 6 de las muestras procedentes de la columna de ácido bórico

Para comprobar que la separación de  $^{14}\text{C}$ -lactato y  $^{14}\text{C}$ -glucosa se realizó correctamente, las fracciones procedentes de ambas columnas se determinaron espectrofotométricamente del mismo modo que el descrito anteriormente, apareciendo la glucosa entre las fracciones 3 y 6 procedentes de la columna de ácido bórico, y el lactato entre las fracciones 2 y 4 procedentes de la columna de ácido fórmico. Además, sobre las columnas también se añadieron 0.4 mL de una mezcla de 2  $\mu\text{Ci/mL}$  de  $[3\text{-}^3\text{H}]$ -glucosa y 0.5  $\mu\text{Ci/mL}$  de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -lactato (Perkin Elmer), comprobándose que el 95% de la radiactividad de la glucosa y el 98% de la radiactividad del lactato se recuperaba de las columnas de borato y formato entre las fracciones 3 y 6, y entre la 2 y 4, respectivamente.

## 17.2. Producción de $^3\text{H}_2\text{O}$ a partir de $[3\text{-}^3\text{H}]$ -glucosa

Para la cuantificación del  $^3\text{H}_2\text{O}$ , los viales fueron equilibrados durante 24 horas con 1 mL de agua, que se usó para cuantificar el contenido de  $^3\text{H}$  en líquido de centelleo (Katz y col., 1965; Hughes y col., 1993).

## **18. Determinación de la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP)**

Se determinó en células GFP<sup>+</sup> separadas por citometría de flujo midiendo la diferencia entre la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> procedente de la oxidación de la [1-<sup>14</sup>C]-glucosa (que se descarboxila en la reacción catalizada por la G6PD) y la producida por la oxidación de la [6-<sup>14</sup>C]-glucosa (que se descarboxila en el ciclo de los ácidos tricarbónicos) (Hothersall y col., 1979; Larrabee 1990).

Las células procedentes del “cell sorting” se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos. Los precipitados se resuspendieron en el tampón Krebs-Henseliet suplementado con glucosa 5 mM y con 2 µCi de [1-<sup>14</sup>C]-glucosa o de 8 µCi de [6-<sup>14</sup>C]-glucosa (Amersham) y se depositaron alícuotas de 500 µL en Erlenmeyer. Cada Erlenmeyer está equipado con un pocillo central en el que se depositó un vial que contenía hidróxido de benzetonio (Sigma-Aldrich). La atmósfera del Erlenmeyer se gaseó con carbógeno [O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5)] durante 20 segundos, tras los cuales, los Erlenmeyer se sellaron y se incubaron a 37 °C durante 1 hora en agitación. Las incubaciones se detuvieron mediante la inyección de 0,2 mL de ácido perclórico 1,75 M, y se dejaron incubando otros 30 minutos para facilitar que el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fuera atrapado por el hidróxido de benzetonio. La radiactividad atrapada por el hidróxido de benzetonio se midió en líquido de centelleo (Universol<sup>TM</sup>) en un contador de centello (Beckman). Se utilizaron blancos sin células en paralelo, cuyos valores se restaron a los de todas las medidas. Para la determinación de proteínas se utilizaron 10 µL de la suspensión celular. Para los cálculos se utilizó la radiactividad específica de la glucosa utilizada (dpm/mol), y los resultados se expresaron como pmoles de glucosa transformados en CO<sub>2</sub>/min/mg de proteína.

## **19. Determinación de la actividad del complejo ubiquitina ligasa APC/C**

Para la determinación de la actividad de APC/C se utilizó el sistema TNT Quick Coupled/Translation (Promega), utilizándose un sustrato conocido de APC/C Cdh1 como es la ciclina B1. Sobre 1 µg del plásmido de ciclina B1 [insertado en el vector pBluescript II KS (Fermentas Inc., Glen Burnie, Maryland, EEUU) que contiene el promotor T3 para la transcripción *in vitro*] se añadieron 20 µL del tampón TNT Quick Mix y 20 µCi de <sup>35</sup>S-Met (Perkin Elmer). Dicha mezcla se incubó 90 minutos a 30 °C y a continuación se realizó la electroforesis de un gel de poliacrilamida que se expuso en una película autorradiográfica para comprobar que la transcripción *in vitro* había funcionado correctamente. Las muestras de neuronas y astrocitos se obtuvieron tras añadir 300 µL de tampón de coimmunoprecipitación frío (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM e inhibidores de proteasas y fosfatasa a la misma concentración que el tampón RIPA a pH 7.6), y se incubaron durante 30 minutos en agitación a 4 °C. Posteriormente se centrifugaron y el sobrenadante se pasó a un eppendorf nuevo.

A continuación se realizó la unión del anticuerpo anti-APC3 a las Dynabeads (Invitrogen) (Kimata y col., 2008), para lo cual se añadieron 250 µL de Dynabeads en un eppendorf que se colocó en el dinal magnético. Las Dynabeads se lavaron 5 veces con PBS y se resuspendieron en 250 µL de PBS sobre el que se añadieron 62,5 µg de anticuerpo anti-APC3 (BD) y se incubó toda la noche a 4 °C en agitación orbital. Transcurrido este tiempo la mezcla se lavó 3 veces con PBS y dos veces con el tampón de acoplamiento (tetraborato de sodio 0,1 M (Sigma-Aldrich) y ácido bórico 0,1 M (Merck) a pH 9). A continuación se añadió 1 mL de DIM-PIM (40 mg dihidrocloruro de dimetil pimelimidato (Sigma-Aldrich) en 4 mL de tetraborato de sodio 0,1 M a pH 9) y se incubó toda la noche a 4 °C en agitación orbital. Al día siguiente la mezcla se lavó 3 veces con el tampón de acoplamiento y una vez con tampón tris a pH 9 y se dejó en agitación orbital a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por último, se lavó 3 veces con tampón de almacenaje (tetraborato de sodio 0,1 M y ácido bórico 0,1 M a pH 8) y se resuspendió en 250 µL de tampón de almacenaje.

Sobre las muestras de astrocitos y de neuronas (1 mg) se añadieron 20  $\mu$ L del complejo APC3-Dynabeads previamente preparado. Dichas muestras se incubaron toda la noche en agitación a 4 °C. A continuación las muestras se lavaron dos veces con tampón de coimmunoprecipitación de alta concentración de sales (NaCl 500 mM) y cuatro veces con el tampón de ubiquitinación (Tris-HCl 20 mM, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, ATP 2 mM e inhibidores de fosfatasa a pH 7.5).

Después del último lavado con el tampón de ubiquitinación, la muestra se resuspendió en 15  $\mu$ L de la mezcla de reacción (Ubiquitina 0,75  $\mu$ g/ $\mu$ L (Boston Biochem, Massachusetts, EEUU), ATP 4 mM (Sigma-Aldrich), DTT 0,3 mM (Sigma-Aldrich), His-Ubc H10 2,5  $\mu$ M (Sigma-Aldrich), UbcH5a 2,5  $\mu$ M (Boston Biochem), MG-132 135  $\mu$ M (Calbiochem), ubiquitina aldehído 1  $\mu$ M (Boston Biochem) en tampón de ubiquitinación). Inmediatamente después se añadió 1  $\mu$ L del sustrato radiactivo (plásmido de ciclina B1, tampón TNT Quick Mix y <sup>35</sup>S-Met). De esta mezcla se recogieron muestras a los 0, 20 y 60 minutos que se añadieron sobre un volumen igual de tampón de carga 2x y se hirvieron durante 5 minutos para detener la reacción. Estas muestras se cargaron en un gel de acrilamida que después de una electroforesis durante 90 minutos a 100 V se secó y se expuso a una película de autorradiografía (Sigma-Aldrich).

## **20. Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y colaboradores (Lowry y col., 1951) o mediante el sistema comercial BCA (Pierce). En ambos casos, se utilizó la albúmina sérica bovina como estándar.

## **21. Análisis estadístico**

Todos los valores se expresaron como medias  $\pm$  S.E.M. (error estándar de la media) de, al menos, tres experimentos independientes. La significatividad se determinó mediante análisis de la varianza, seguido del test de la menor diferencia significativa de rango múltiple (para comparaciones múltiples) o el test de la *t* de Student (para comparaciones entre dos únicos grupos de valores). En todos los casos, un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

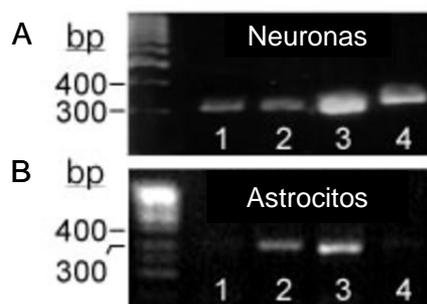
## **RESULTADOS**





## 1. Identificación de las isoformas de la Pfkfb que se expresan en neuronas y astrocitos.

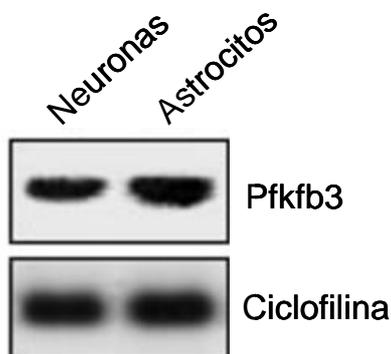
Con objeto de conocer la distinta expresión de las isoformas de la Pfkfb en neuronas y astrocitos, se realizaron RT-PCRs empleando oligonucleótidos específicos para cada isoforma (ver tabla VIII de material y métodos). Estos oligonucleótidos se diseñaron a partir de los DNAs publicados de la secuencia de rata de cada isoforma (NM\_012621 para la Pfkfb1, NM\_080477 para la Pfkfb2, NM\_057135 para la Pfkfb3 y NM\_019333 para la Pfkfb4). Con estos oligonucleótidos realizamos RT-PCRs empleando como molde RNA total, extraído de neuronas terminalmente diferenciadas o astrocitos en cultivo. De este modo comprobamos que el RNAm más abundante es el de la isoforma Pfkfb3 en ambos tipos celulares (Figs. 1A y B). No obstante, se observó que las neuronas también expresan, aunque en menor medida, el RNAm de las otras tres isoformas, y los astrocitos el de la isoforma Pfkfb2 y, de forma negligible, el de las isoformas Pfkfb1 y Pfkfb4 (Figs. 1A y B).



**FIGURA 1. Expresión del RNAm de las isoformas de la Pfkfb en neuronas y astrocitos.** El RNAm se obtuvo de extractos de neuronas (A) y astrocitos (B) utilizando el GenElute<sup>TM</sup> Mammalian Total RNA Miniprep Kit.

La expresión del RNAm de la isoforma Pfkfb3 se confirmó mediante transferencia de Northern. Para ello empleamos como sonda el cDNA del dominio

kinasa. En la figura 2 se puede observar como tanto neuronas como astrocitos expresan el RNAm de la Pfkfb3.



**FIGURA 2. Expresión del RNAm de la Pfkfb3 de neuronas y astrocitos plenamente diferenciados.** El RNAm se obtuvo de extractos de neuronas y astrocitos utilizando el GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit. La transferencia de Northern muestra la expresión del RNAm de la Pfkfb3 frente a un control de carga (ciclofilina).

## **2. Estudio de la expresión del RNAm de las variantes alternativas de la Pfkfb3 de neuronas y astrocitos.**

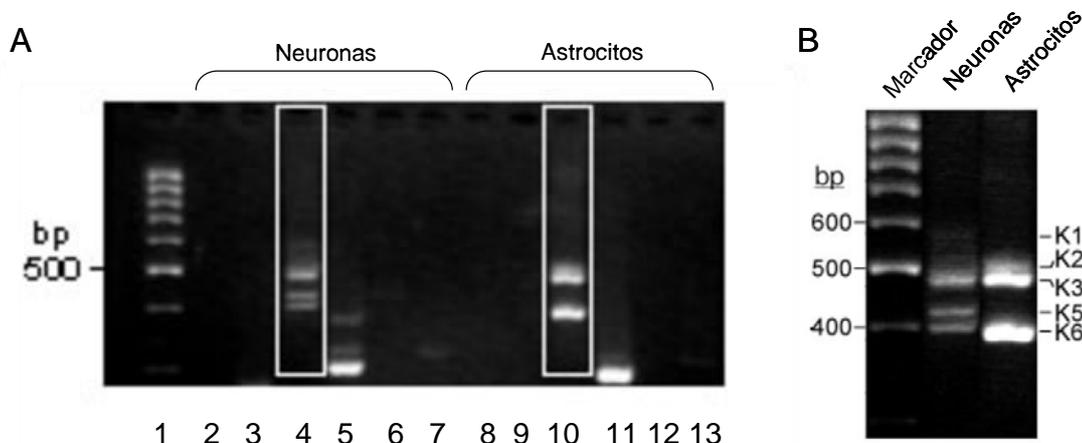
Dado que la isoforma Pfkfb3 de rata consta de 8 variantes alternativas, denominadas RB2K1-K8 (Watanabe y col., 1997) y que el RNAm de esta isoforma es el más abundante tanto en neuronas como en astrocitos, nos propusimos identificar la(s) variante(s) alternativa(s) de estas células. Del análisis de la secuencia de las ocho variantes alternativas dedujimos que estas variantes alternativas se pueden agrupar en dos clases diferentes: las que contienen y las que no contienen un fragmento que codifica para 29 aminoácidos. Así, este fragmento codificado por el exón B de la región variable del gen de la Pfkfb3 está presente sólo en 4 de las 8 variantes alternativas, que son RB2K1, 2, 3 y 7 (ver Fig. VI de la introducción). De este modo RB2K1 sólo difiere de RB2K4 en que RB2K1 contiene el fragmento. Lo mismo ocurre con las parejas RB2K2-RB2K5, RB2K3-RB2K6 y RB2K7-RB2K8.

Variante alternativa	Entrada en Swiss Prot	Secuencia
		447 <span style="float: right;">500</span>
RB2K1	O35552-1	EAVKIQHFASVVRPSSYTELDFLSVESAKQDAKKGNPLMRRNSVTPLASPEP
RB2K2	O35552-2	EAVKIQHFASVVRPSSYTELDFLSVESAKQDAKKGNPLMRRNSVTPLASPEP
RB2K3	O35552-3	EAVKIQHFASVVRPSSYTELDFLSVESAKQDAKKGNPLMRRNSVTPLASPEP
RB2K4	O35552-4	E-----DAKKGNPLMRRNSVTPLASPEP
RB2K5	O35552-5	E-----DAKKGNPLMRRNSVTPLASPEP
RB2K6	O35552-6	E-----DAKKGNPLMRRNSVTPLASPEP
RB2K7	O35552-7	EAVKIQHFASVVRPSSYTELDFLSVESAKQDAKKGNPLMRRNSVTPLASPEP
RB2K8	O35552-8	E-----DAKKGNPLMRRNSVTPLASPEP
		501 <span style="float: right;">550</span>
RB2K1	O35552-1	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQPLLKGACLRTVCHIFSKFSPY
RB2K2	O35552-2	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQPLLKGACLT
RB2K3	O35552-3	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQNMRSPRSGAESSQKH
RB2K4	O35552-4	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQPLLKGACLRTVCHIFSKFSPY
RB2K5	O35552-5	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQPLLKGACLT
RB2K6	O35552-6	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQNMRSPRSGAESSQKH
RB2K7	O35552-7	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQPLLKGACL
RB2K8	O35552-8	TKKPRINSFEEHVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQPLLKGACL

**TABLA I. Secuencia de las 8 variantes alternativas de la Pfkfb3 desde el aminoácido 447 hasta el final de la secuencia.** Los aminoácidos del 1 al 447 son comunes a todas las variantes alternativas. Obsérvese que las variantes alternativas de la Pfkfb3 se pueden agrupar en dos clases: las que contienen el fragmento de 29 aminoácidos y las que no lo contienen. Así, las parejas RB2K1-RB2K4, RB2K2-RB2K5, RB2K3-RB2K6 y RB2K7-RB2K8 son idénticas excepto en la presencia de dicho fragmento.

Así, diseñamos 8 oligonucleótidos para diferenciar estas variantes alternativas (ver tabla IX de material y métodos) y realizamos RT-PCRs a partir del RNA total de neuronas y astrocitos. De este modo, comprobamos que las variantes alternativas más abundantes tanto en neuronas como en astrocitos son la RB2K3 y la RB2K6 (Figs. 3A y

B). No obstante, aunque en mucho menor medida, las neuronas también expresan RB2K1, RB2K2, RB2K5 y RB2K7, y los astrocitos RB2K2 y RB2K7 (Figs. 3A y B).



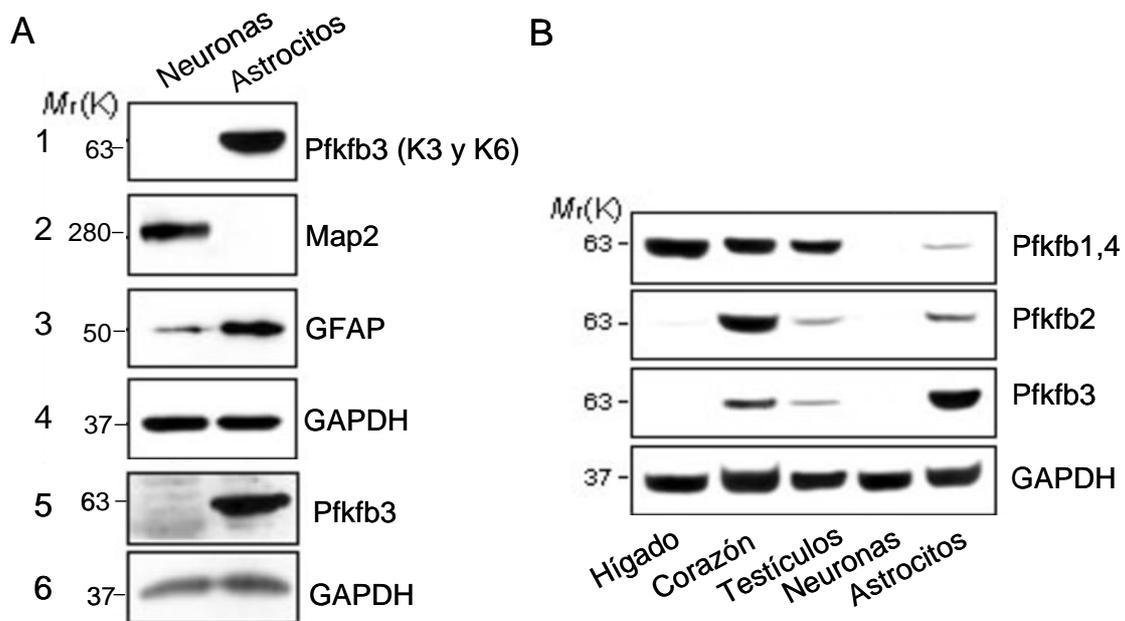
**FIGURA 3. Expresión del RNAm de las variantes alternativas de la isoforma Pfkfb3 de neuronas y astrocitos.** El RNA total se obtuvo de neuronas y astrocitos utilizando el GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit. Los tamaños de los cDNA amplificados oscilan aproximadamente entre 300 y 600 pares de bases (bp). (A) Carril 1: marcador de peso molecular. Carriles 2 al 7: neuronas; carriles 8 al 13: astrocitos. En los carriles 2 y 8 se utilizaron los oligos 9 y 10 (ver tabla IX de material y métodos), que permiten amplificar las variantes alternativas RB2K1 y RB2K4. En los carriles 3 y 9 se utilizaron los oligos 17 y 10, que permiten amplificar RB2K1. En los carriles 4 y 10 se utilizaron los oligos 11 y 12, que permiten amplificar RB2K1-RB2K6. En los carriles 5 y 11 se utilizaron los oligos 15 y 12, que permiten amplificar RB2K1-RB2K3. En los carriles 6 y 12 se utilizaron los oligos 13 y 14, que permiten amplificar RB2K7 y RB2K8. Por último, en los carriles 7 y 13 se utilizaron los oligos 15 y 14, que permiten amplificar RB2K7. (B) Se muestran los carriles 4 y 10 de la figura A.

### 3. Expresión de la proteína Pfkfb en neuronas y astrocitos

Con objeto de identificar si las variantes RB2K3 y RB2K6 expresaban la proteína, decidimos diseñar y obtener un anticuerpo que reconociera estas variantes mayoritarias. La especificidad y sensibilidad de este anticuerpo se confirmó mediante dot blot y transferencia de Western de extractos proteicos de células que sobreexpresaban estas variantes alternativas (ver figura 4 de material y métodos). Empleando este anticuerpo pudimos observar que las neuronas no expresan las variantes alternativas RB2K3 y RB2K6, mientras que los astrocitos sí (Fig. 4A, panel 1). No

obstante, para comprobar si las neuronas expresaban la proteína de alguna otra variante alternativa, decidimos emplear un anticuerpo comercial (este anticuerpo reconoce a la Pfkfb3 de ratón, rata y humano, con lo que está diseñado contra una región común de la secuencia de estas tres especies. Así, las regiones comunes a las tres especies, lo son también a todas las variantes alternativas; PFK-2 brain/placental (L-13) sc-10091; Santa Cruz Biotechnology). Como se observa en la figura 4A, en el panel 5, la Pfkfb3 tampoco se detectó en neuronas pero se encontró expresada muy profusamente en los astrocitos.

Por otra parte, la proteína de las isoformas 1, 2 y 4 tampoco se expresa en neuronas (Fig. 4B), mientras que los astrocitos contienen cantidades apreciables de las mismas, aunque en niveles inferiores a Pfkfb3 (Fig. 4B).



**FIGURA 4. Expresión de la proteína de Pfkfb en neuronas y astrocitos.** (A) Expresión de la isoforma Pfkfb3 en neuronas y astrocitos utilizando un anticuerpo que reconoce las variantes alternativas K3 y K6 (panel 1) y otro que no distingue las variantes alternativas (panel 5). Map2 y GFAP se utilizaron para confirmar la pureza de los cultivos. (B) Expresión de todas las isoformas de la Pfkfb en neuronas y astrocitos. Los extractos de hígado, corazón y testículos se utilizaron como controles positivos. La razón por la cual Pfkfb1 y Pfkfb4 aparecen en el mismo western blot es debida a que no dispusimos de ningún anticuerpo comercial que las distinguiera.

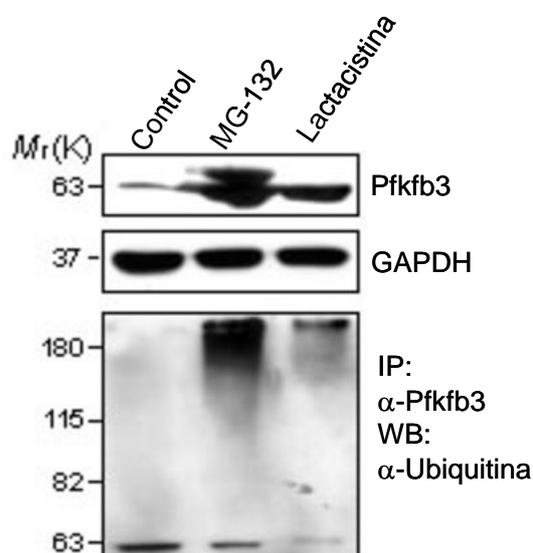
Con objeto de eliminar la posibilidad de que los resultados referentes a la expresión de Pfkfb3 en neuronas y astrocitos fueran un artefacto del cultivo, decidimos estudiar su expresión en la corteza cerebral de rata. Como se observa en la figura 5, las células inmunorreactivas para el marcador neuronal NeuN<sup>+</sup> no colocalizan con Pfkfb3, mientras que las células GFAP<sup>+</sup> (marcador glial) si colocalizan con Pfkfb3. Estos resultados confirman que la Pfkfb3 no se expresa normalmente en neuronas, al menos en corteza de rata.

**FIGURA 5. Expresión de Pfkfb3 en corteza de rata.** En (A) se puede observar que Pfkfb3 colocaliza con GFAP. En la columna A se encuentra marcada Pfkfb3 en verde, en la columna B se encuentra marcada GFAP en rojo, en la columna C se encuentran marcados los núcleos celulares en azul con DAPI y, en la columna D se puede observar la expresión de los tres marcadores juntos. En (B) se muestra la ausencia de colocalización de Pfkfb3 y NeuN.

#### 4. Pfkfb3 se degrada proteolíticamente en neuronas

La expresión del RNAm de la Pfkfb3, junto a la ausencia de proteína nos indujo a hipotetizar que la Pfkfb3 podría estar sometida a regulación post-transcripcional (ver anexo 7).

Para comprobarlo, las neuronas se incubaron con MG-132 y lactacistina, inhibidores del proteosoma. Como se observa en la figura 6 (panel superior), estos compuestos provocaron la acumulación de Pfkfb3 en neuronas al cabo de tan solo 30 minutos, lo que sugiere que, en condiciones normales, la Pfkfb3 está sometida a una activa degradación proteolítica. La inmunoprecipitación de Pfkfb3 seguida de Western Blot anti-ubiquitina mostró que la Pfkfb3 acumulada estaba ubiquitinada (Fig. 6, panel inferior).



**FIGURA 6. Efecto de la inhibición del proteosoma sobre la expresión de Pfkfb3 en neuronas.** En el panel superior se puede observar la acumulación de Pfkfb3 en neuronas tras 30 minutos de tratamiento con MG-132 y lactacistina. En el panel inferior, las células se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-Pfkfb3 y se sometieron a una transferencia de Western con el anticuerpo anti-ubiquitina.

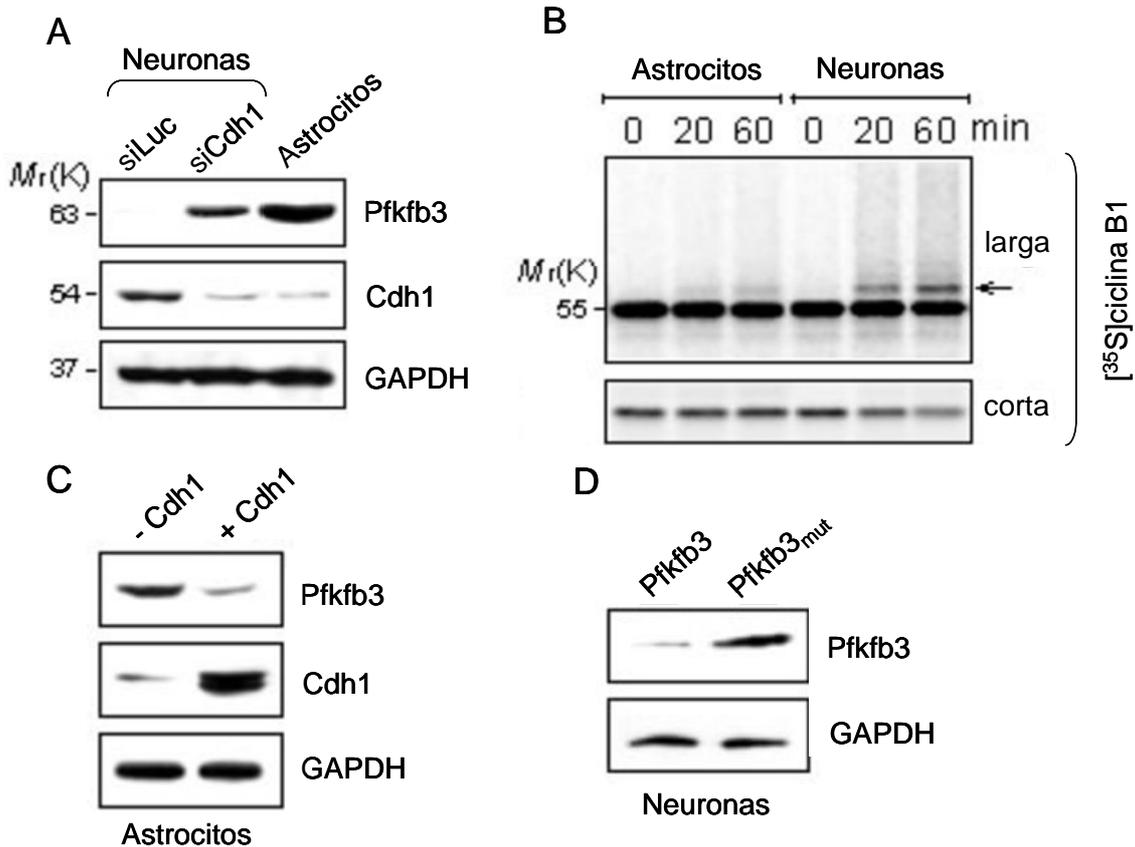
Del análisis de la secuencia de la Pfkfb3 se encontró que contiene, en la posición 142, la secuencia KEN, ausente en las isoformas 1, 2 y 4 (Tabla II). La secuencia KEN, es secuencia diana de APC/C (Anaphase-promoting complex/cyclosome) (Pfleger y Kirschner 2000) y su cofactor Cdh1, una E3 ubiquitina ligasa implicada en la degradación de la ciclina B1 (Almeida y col., 2005; Maestre y col., 2008) (ver anexo 8).

Isoforma de Pfkfb	Entrada de Swiss prot	Secuencia
		140      147 
Pfkfb1	P07953	FAKEHGYK
Pfkfb2	Q9JJH5	FAQKNAFK
Pfkfb3	O35552	FAKENDFK
Pfkfb4	P25114	FGEQNGYK

**TABLA II. Secuencia de las distintas isoformas de la Pfkfb entre los aminoácidos 140 y 147.** Esta tabla muestra que sólo la isoforma Pfkfb3, pero no las isoformas 1, 2 y 4, contiene la caja KEN. Todas las variantes alternativas de la Pfkfb3 contienen esta caja (datos no mostrados).

Con objeto de comprobar que APC/C-Cdh1 estaba implicada en la degradación de Pfkfb3, tratamos a las neuronas con un siRNA diseñado para silenciar Cdh1. Como se observa en la figura 7A, a los 3 días de tratamiento, la proteína Cdh1 disminuyó dramáticamente, mientras que Pfkfb3 se acumuló. Sin embargo, los astrocitos expresaron niveles de Cdh1 negligibles (Fig. 7A). Con los datos anteriores, consideramos de interés estudiar la actividad del complejo APC/C-Cdh1 en neuronas y astrocitos. Para ello realizamos un ensayo de ubiquitinación *in vitro* y comprobamos que la actividad del complejo APC/C-Cdh1 es muy superior en neuronas que en astrocitos (Fig. 7B). Dado que estos resultados sugieren que Pfkfb3 se acumula en astrocitos por su baja expresión de Cdh1 y actividad de APC/C, decidimos investigar el efecto de la sobreexpresión de Cdh1 en astrocitos. Así, la sobreexpresión de Cdh1 redujo sustancialmente los niveles de Pfkfb3 en astrocitos (Fig. 7C). Por último, quisimos confirmar si la caja KEN estaba implicada en la degradación de Pfkfb3 por el complejo APC/C-Cdh1. Para ello, realizamos mutagénesis dirigida en el cDNA de Pfkfb3 con objeto de mutar la secuencia KEN a AAA. Las neuronas se transfectaron

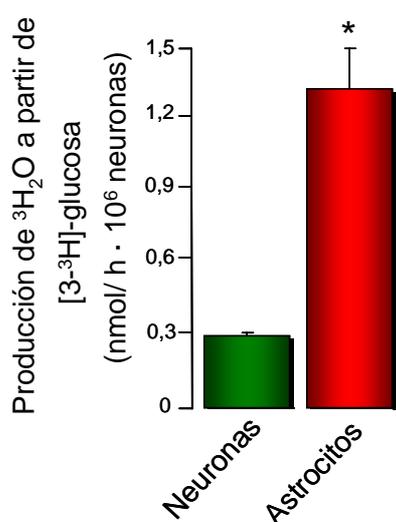
con el cDNA de Pfkfb3 silvestre y mutado, y se diferenciaron los niveles de Pfkfb3 mediante transferencia de Western en neuronas previamente separadas por citometría de flujo. Como se observa en la figura 7D, la mutación de la caja KEN provocó la acumulación de Pfkfb3 en neuronas, lo que confirma que la Pfkfb3 es un sustrato de APC/C-Cdh1.



**FIGURA 7. Función de Cdh1 en la estabilidad de Pfkfb3 en neuronas y astrocitos.** (A) Transferencia de Western de extractos de proteínas de neuronas y astrocitos. Las neuronas se trataron durante 3 días con un siRNA anti-Cdh1 o anti-luciferasa (siLuc) a una concentración de 100 nM. (B) Ensayo de ubiquitinación *in vitro* para determinar la actividad del complejo APC/C-Cdh1 en neuronas y astrocitos, empleando como sustrato, ciclina B1. Obsérvese que, a los 20 y 60 minutos las neuronas muestran una banda (indicada por la flecha) que corresponde a la versión ubiquitinada de ciclina B1, mientras que los astrocitos no. (C) WB de extractos de astrocitos en los que se sobreexpresó Cdh1 (+ Cdh1) o su correspondiente vector vacío (pIRES2.eGFP- Cdh1). (D) Las neuronas se transfectaron con Pfkfb3 silvestre o con su forma mutada en la caja KEN y se separaron con un citómetro de flujo. A continuación, se realizó un Western Blot anti-Pfkfb3 con la población transfectada.

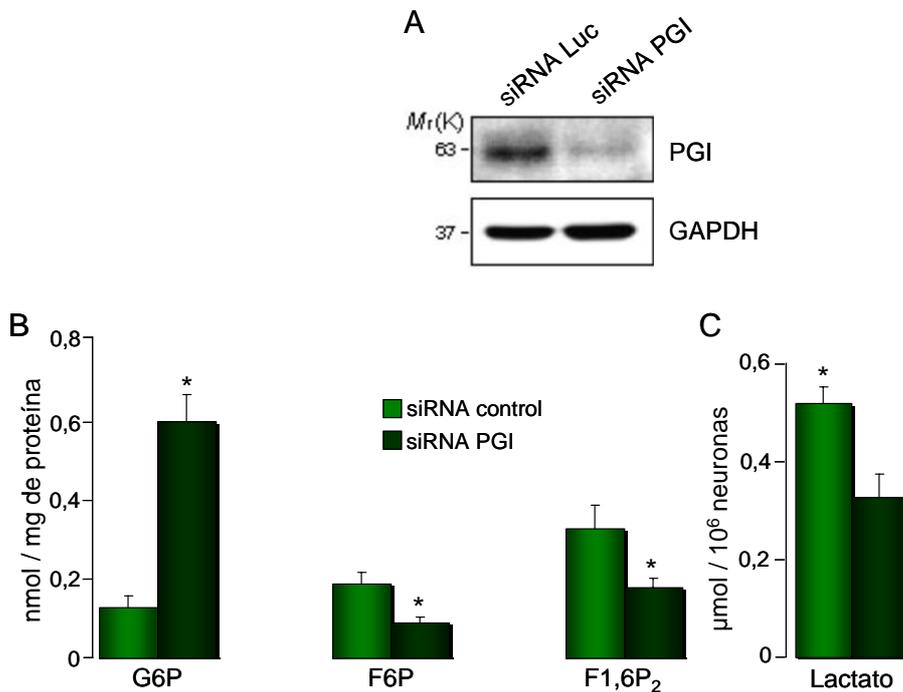
## 5. Regulación de la glucólisis por la vía Cdh1-Pfkfb3

A la vista de los resultados anteriores, las neuronas carecen de Pfkfb3 porque se degrada por la vía de la ubiquitina-proteosoma, mientras que los astrocitos, con baja actividad APC/C-Cdh1, acumulan Pfkfb3. Nuestro siguiente propósito fue, así, comprobar si la regulación de la Pfkfb3 por Cdh1 tiene implicaciones funcionales en la glucólisis. Resultados anteriores de nuestro grupo (Almeida y col., 2004), pusieron de manifiesto que, en condiciones basales, la producción de lactato por los astrocitos es mayor que la de las neuronas. Así, parece que hay una correlación entre la expresión de Pfkfb3 y la velocidad de la glucólisis en estos dos tipos celulares. No obstante, en esta Memoria quisimos profundizar en esta hipótesis, para lo cual adoptamos un método de determinación del flujo glucolítico consistente en la medida de la producción de  $^3\text{H}_2\text{O}$  a partir de  $[\text{3-}^3\text{H}]$ -glucosa. Así, el H del C-3 de la glucosa se convierte en agua en la reacción catalizada por la aldolasa, y las medidas de formación de  $^3\text{H}_2\text{O}$  a partir de  $[\text{3-}^3\text{H}]$ -glucosa en un buen índice del flujo glucolítico. Como se observa en la figura 8 la velocidad del flujo glucolítico es unas 5 veces superior en astrocitos que en neuronas en condiciones basales.



**FIGURA 8. Flujo glucolítico de neuronas y astrocitos.** En esta figura podemos observar la producción de agua tritiada liberada a partir de  $[\text{3-}^3\text{H}]$ -glucosa. Para ello, las células se incubaron durante 90 minutos a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  en Erlenmeyer cerrados siguiendo el protocolo descrito en la sección 17 de material y métodos. \* $p < 0,05$  con respecto a neuronas.

Seguidamente nos propusimos diseñar una herramienta que nos permitiera inhibir el flujo de glucosa a través de la glucólisis en un paso anterior al catalizado por la Pfkfb3. Así, diseñamos un siRNA dirigido contra la fosfoglucosa isomerasa (PGI). Como se observa en la figura 9A, este siRNA indujo una dramática disminución de la proteína de la Pfkfb3, efecto que se acompañó del aumento del sustrato (G6P) y la disminución de su producto (F6P). Estos resultados sugieren que el siRNA contra PGI es efectivo en neuronas en cultivo. Además, este tratamiento disminuyó los niveles de F1,6P<sub>2</sub> y de lactato, lo que sugiere inhibición de la glucólisis (Figs. 9B y C).

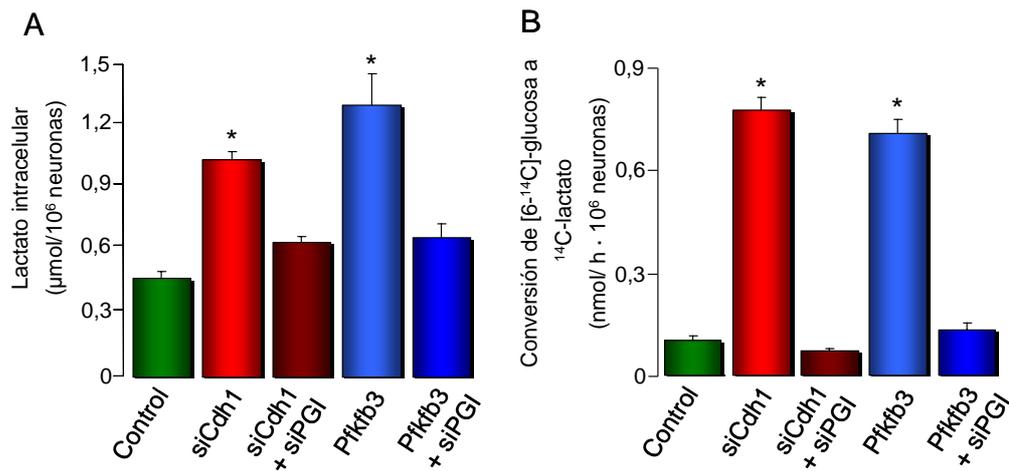


**FIGURA 9. Inhibición de PGI mediante siRNA.** Las neuronas se transfectaron con un siRNA frente a PGI. (A) Transferencia de Western que muestra la disminución de la proteína PGI a los 3 días de transfección. (B) Concentración de G6P, F6P y de F1,6P<sub>2</sub> que muestran la acumulación de G6P y el descenso de F6P y de F1,6P<sub>2</sub>. (C) Concentración de lactato intracelular. \*p<0,05 con respecto a las muestras control.

Dado que la inhibición de Cdh1 inducía acumulación de Pfkfb3 (Fig. 7A), a continuación decidimos investigar si este efecto se acompañaba de un incremento de la velocidad de la glucólisis. Para ello, las neuronas se trataron con un siRNA de Cdh1 y determinamos la concentración intracelular de lactato. Como se observa en la figura

10A, el silenciamiento de Cdh1 produjo un aumento de la concentración de lactato de, aproximadamente, el doble. Es más, este efecto se previno con el silenciamiento de PGI, lo que indica que el efecto se debió al consumo de glucosa a través de la glucolisis (Fig. 10A). No obstante, teniendo en cuenta que la determinación intracelular de lactato podría ser el reflejo del lactato en el estado estacionario, pensamos que podríamos estar infravalorando cambios más dramáticos en la velocidad de la glucolisis. Así, pusimos a punto en el laboratorio una técnica que nos permitiera valorar, con más precisión y fiabilidad, la velocidad de transformación de glucosa a lactato. Como se observa en la figura 10B, la velocidad de conversión de [6-<sup>14</sup>C]-glucosa a <sup>14</sup>C-lactato incrementó unas 8 veces en neuronas tras la inhibición de Cdh1, y este efecto se previno completamente por el co-silenciamiento de PGI. Estos resultados confirman el incremento de la velocidad del flujo glucolítico a lactato por inhibición de Cdh1, así como sugieren que la determinación de la concentración de lactato en el estado estacionario podría estar infravalorando la estimación del flujo glucolítico hasta lactato.

Puesto que la inhibición de Cdh1 podía estar causando el incremento de la glucolisis a través de un mecanismo diferente a Pfkfb3, seguidamente nos propusimos estudiar si la sobreexpresión de Pfkfb3 era capaz, por si sola, de incrementar la velocidad de la glucolisis. Para ello, las neuronas en cultivo primero se transfectaron con el cDNA completo que codifica para la Pfkfb3 (variante alternativa K6), se separaron por citometría de flujo atendiendo a la expresión de GFP e inmediatamente se emplearon para determinar tanto la concentración de lactato como la velocidad de conversión de glucosa a lactato. Como se observa en la figura 10A, la sobreexpresión de Pfkfb3 duplicó aproximadamente la concentración de lactato, e incrementó unas 7 veces la velocidad de conversión de [6-<sup>14</sup>C]-glucosa a <sup>14</sup>C-lactato (Fig. 10B). Ambos efectos se previenen por completo en neuronas en las que previamente de había silenciado PGI mediante siRNA (Figs. 10A y B). Así, la expresión de Pfkfb3 en neuronas es suficiente para incrementar el flujo glucolítico hasta lactato.



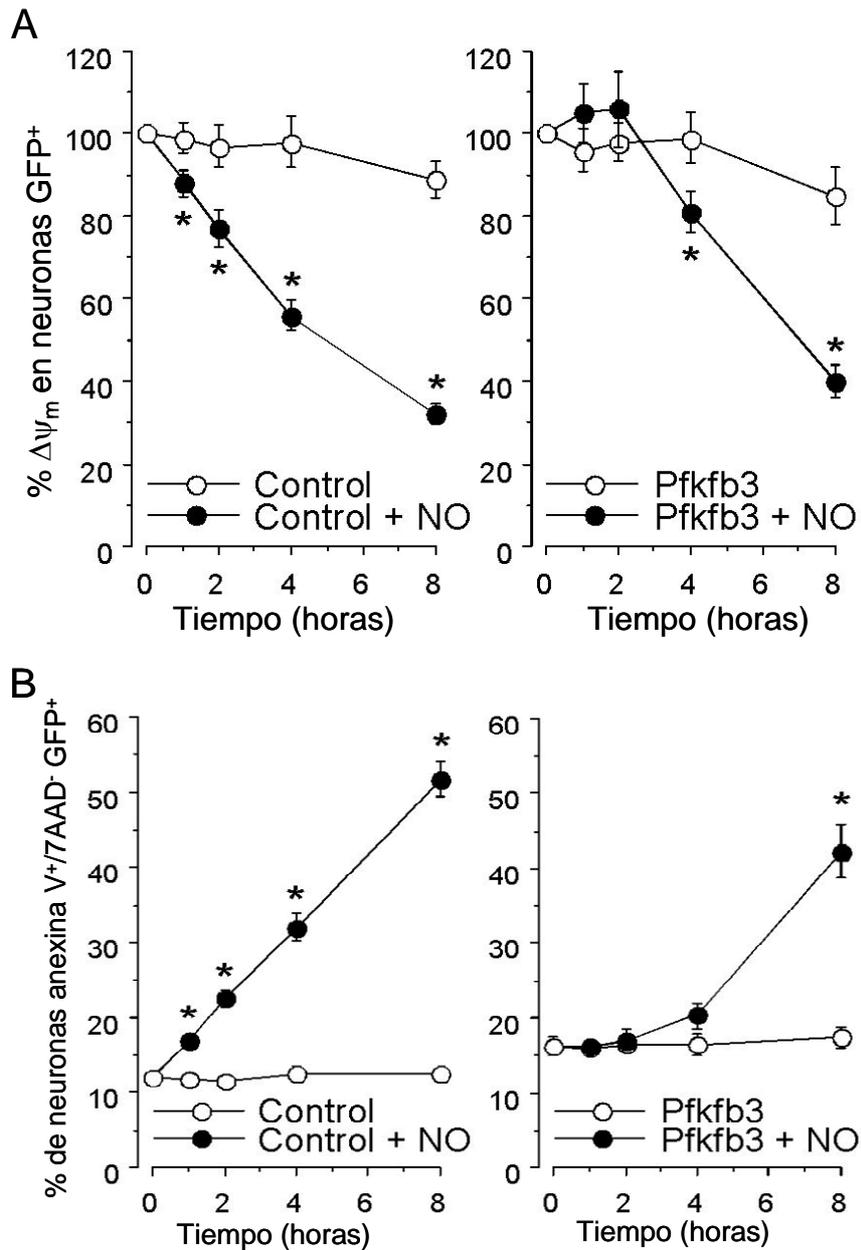
**FIGURA 10. Efecto de Pfkfb3 sobre la glucólisis neuronal.** (A) Determinación de la concentración de lactato intracelular en neuronas transfectadas con siRNA durante tres días y con cDNA durante 24 horas. (B) Determinación de la conversión de [6-<sup>14</sup>C]-glucosa a <sup>14</sup>C-lactato mediante el método descrito en la sección 17 de material y métodos. Los controles son una media de los valores de células transfectadas con siRNA contra la luciferasa y de la transfección con el vector pIRES2.eGFP vacío.

## 6. Influencia de la modulación de la glucólisis sobre la supervivencia neuronal

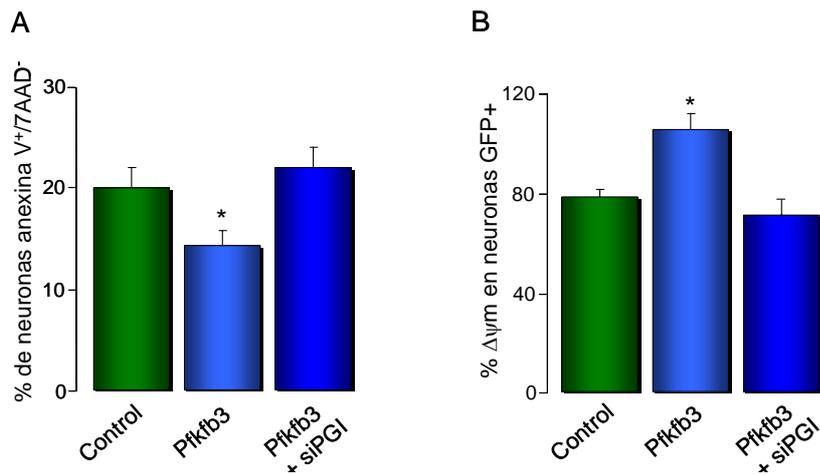
Resultados anteriores de nuestro laboratorio (Almeida y col., 2004) pusieron de manifiesto que, frente a la inhibición de la función energética mitocondrial, los astrocitos sobreviven gracias a que la velocidad de la glucólisis se reactiva en estas células. Es más, en aquel trabajo se dilucidó el mecanismo molecular implicado en dicha resistencia, que resultó estar modulado por la activación de la Pfkfb3 a través de la proteína kinasa dependiente de AMP (AMPK) (Almeida y col., 2004). Sin embargo, las neuronas sometidas a idéntico tratamiento, no son capaces de reactivar la glucólisis y mueren (Almeida y col., 2001; Almeida y col., 2004). Es más, los resultados anteriores de nuestro laboratorio también habían demostrado que el ATP generado glucolíticamente por los astrocitos en respuesta a la inhibición mitocondrial es el responsable de dicha resistencia (Almeida y col., 2001). Así, este ATP servía como sustrato de la ATP sintasa (actividad reversa), ayudando así a mantener (e incluso aumentar ligeramente) el potencial de membrana mitocondrial (Almeida y col., 2001).

A la vista de estos resultados, nuestro siguiente objetivo consistió en investigar si la sobreexpresión de Pfkfb3 en neuronas, por dotarlas de mayor actividad glucolítica, podría conferir a estas células resistencia frente a la inhibición mitocondrial.

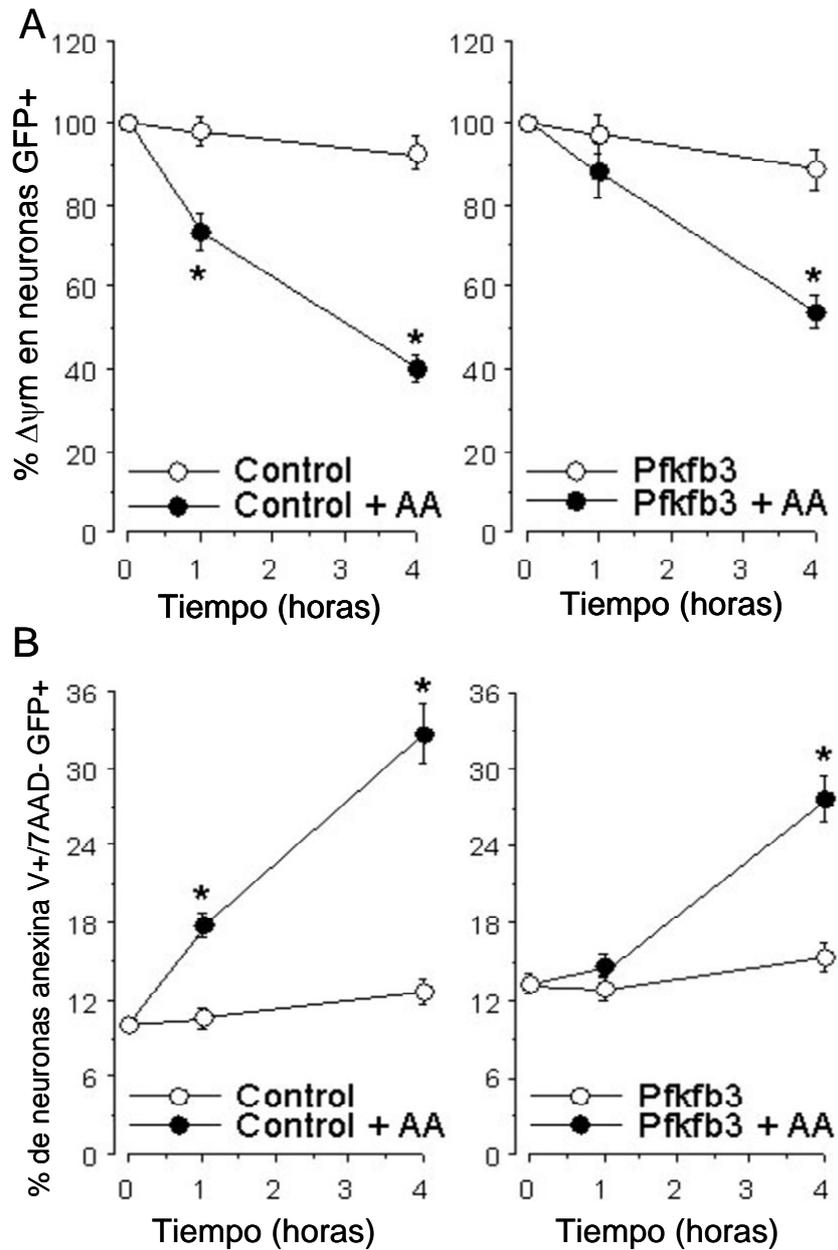
Para desarrollar este objetivo, se sobreexpresó Pfkfb3, a concentraciones lo suficientemente bajas como para no causar toxicidad, en neuronas y después se sometieron a tratamiento con óxido nítrico a concentraciones y tiempos que, en neuronas normales, causa despolarización de la mitocondria seguido de apoptosis (Almeida y col., 2001). Según se aprecia en la figura 11, el tratamiento con NO causó una disminución del potencial de membrana mitocondrial y un aumento de la proporción de neuronas apoptóticas, a juzgar por el número de células anexina V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>. Sin embargo, la sobreexpresión de Pfkfb3 protegió, notablemente, tanto la caída del  $\Delta\psi_m$  como el aumento de apoptosis, al menos, durante las primeras 2 a 4 horas de tratamiento con NO (Figs. 11A y B). Es más, la protección que Pfkfb3 ejerce sobre la despolarización mitocondrial y apoptosis causada por NO se previno íntegramente mediante el silenciamiento de PGI (Figs. 12A y B). Idénticos resultados se obtuvieron empleando una toxina mitocondrial más específica que el NO, como es la antimicina A (Figs 13 y 14). En ambos casos se observó, no obstante, que la protección promovida por Pfkfb3 fue tan solo transitoria, pues a las 4-8 horas las neuronas sucumbieron a una profunda despolarización mitocondrial seguida de apoptosis (Figs. 11 y 13).



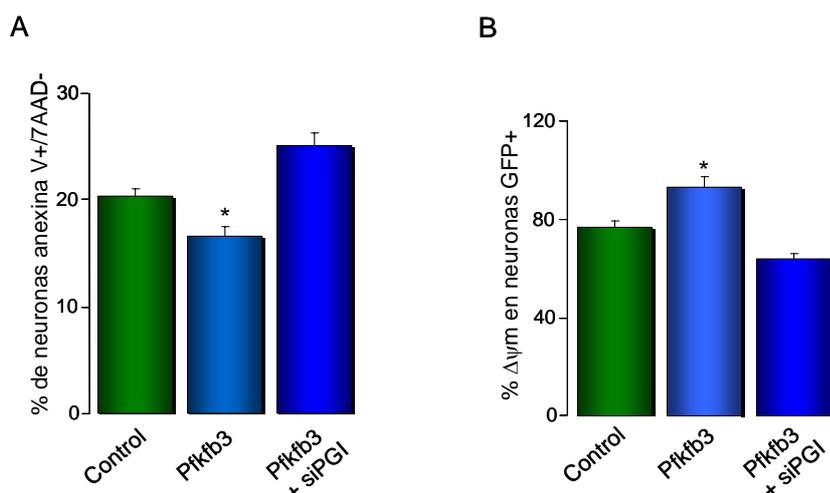
**FIGURA 11. Pfkfb3 causa neuroprotección frente al óxido nítrico de manera transitoria.** Las neuronas se transfectaron durante 24 horas con el vector pIRES2.eGFP vacío o con el cDNA de Pfkfb3. Transcurrido este tiempo se trataron con DETA-NO 0,5 mM durante los tiempos indicados en la figura. En dichos tiempos se realizaron (A) medidas del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y (B) de apoptosis sobre la población GFP<sup>+</sup>. \*p<0,05 con respecto al control.



**FIGURA 12. El efecto neuroprotector transitorio de Pfkfb3 frente al óxido nítrico se debe al incremento del flujo glucolítico.** Las neuronas se transfectaron durante tres días con el siRNA contra PGI o contra la luciferasa. Las transfecciones con el vector pIRES2.eGFP vacío (control) o con el cDNA de Pfkfb3 se realizaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo las neuronas se trataron con DETA-NO 0,5 mM durante dos horas, tras las cuales se realizaron medidas de la apoptosis (A) y (B) del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) sobre la población GFP<sup>+</sup>. \*p<0,05 con respecto al control.

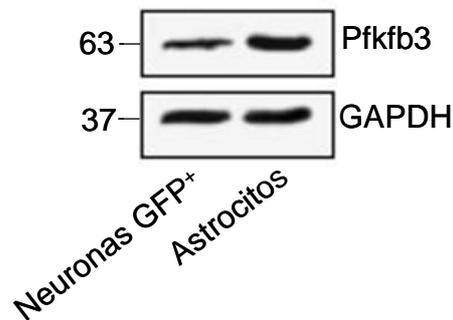


**FIGURA 13. Pfkfb3 causa neuroprotección frente a antimicina A de manera transitoria.** Las neuronas se transfectaron durante 24 horas con el vector pIRES2.eGFP vacío o con el cDNA de Pfkfb3. Transcurrido este tiempo se trataron con antimicina A 5  $\mu$ M durante los tiempos indicados en la figura. En dichos tiempos se realizaron (A) medidas del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y (B) de apoptosis sobre la población GFP<sup>+</sup>. \* $p < 0,05$  con respecto al control.



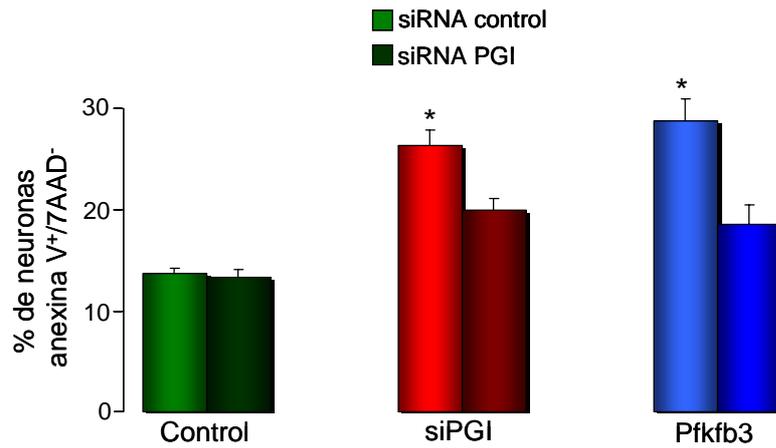
**FIGURA 14. El efecto neuroprotector transitorio de Pfkfb3 frente a la antimicina A se debe al incremento del flujo glucolítico.** Las neuronas se transfectaron durante tres días con el siRNA frente a PGI o frente a la luciferasa. Las transfecciones con el vector pIRES2.eGFP vacío (control) o con el cDNA de Pfkfb3 se realizaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo las neuronas se trataron con antimicina A 5  $\mu$ M durante una hora, tras la cual se realizaron medidas (A) de la apoptosis y (B) del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) sobre la población GFP<sup>+</sup>. \*p<0,05 con respecto al control.

Es de resaltar la transitoriedad de la protección causada por la sobreexpresión de Pfkfb3. En este sentido, hay que indicar que estos experimentos se llevaron a cabo empleando concentraciones de cDNA de Pfkfb3 relativamente bajas (0,8  $\mu$ g/mL), puesto que habíamos observado una cierta toxicidad a concentraciones de cDNA dentro del rango habitual (1,6  $\mu$ g/mL). Motivados por este efecto neurotóxico, a continuación decidimos estudiar el efecto de la expresión de Pfkfb3 empleando concentraciones de cDNA de Pfkfb3 suficientes como para acumular la proteína Pfkfb3 en abundancia compatible con la que normalmente se observa en astrocitos. Así, como se observa en la Fig. 15, la transfección de las neuronas con 1,6  $\mu$ g/mL de cDNA de Pfkfb3 fue suficiente como para expresar Pfkfb3 en abundancia comparable a la de los astrocitos. Por lo tanto, todos los experimentos siguientes se realizaron empleando esta concentración de cDNA de Pfkfb3.

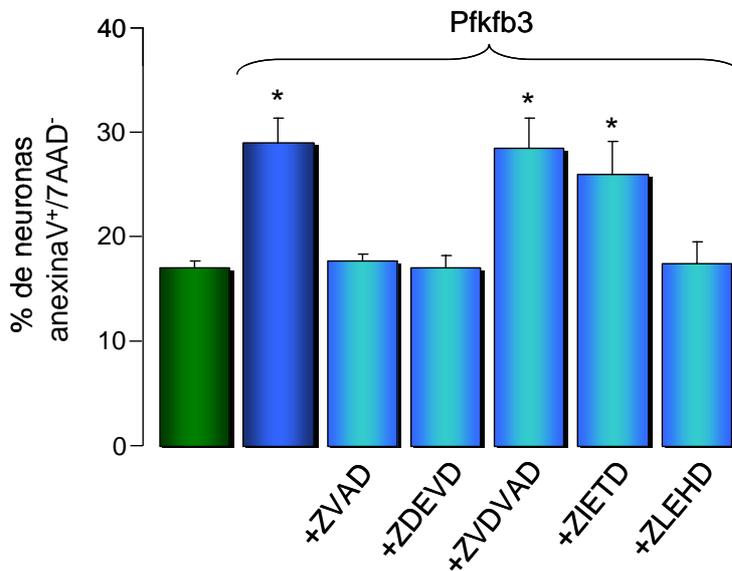


**Figura 15. Comparación de la expresión de Pfkfb3 en astroцитos y en neuronas transfectadas con 1,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del cDNA de Pfkfb3.** Las neuronas se transfectaron con el 1,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del cDNA de Pfkfb3 durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se separaron por citometría de flujo las células  $\text{GFP}^+$  y, con los extractos proteicos de estas células, se realizó la transferencia de Western.

La expresión de Pfkfb3 en neuronas indujo un aumento de la proporción de neuronas anexina V-positivas (dentro de la subpoblación 7-AAD-negativa) (Fig. 16), lo que sugiere muerte por apoptosis. No obstante, decidimos corroborarlo mediante el uso de inhibidores de caspasas. Así, como se observa en la Fig. 17, el incremento en la proporción de neuronas anexina V+/7-AAD- producido por la sobre-expresión de Pfkfb3 se previno en presencia de los compuestos Z-VAD, Z-DEVD (inhibidores inespecíficos de caspasas) y Z-LEHD (inhibidor de la caspasa 9), pero no en presencia de los compuestos Z-VDVAD y Z-IETD. Estos resultados confirman que el tipo de muerte neuronal desencadenada por Pfkfb3 es de tipo apoptótico (ver anexo 9).

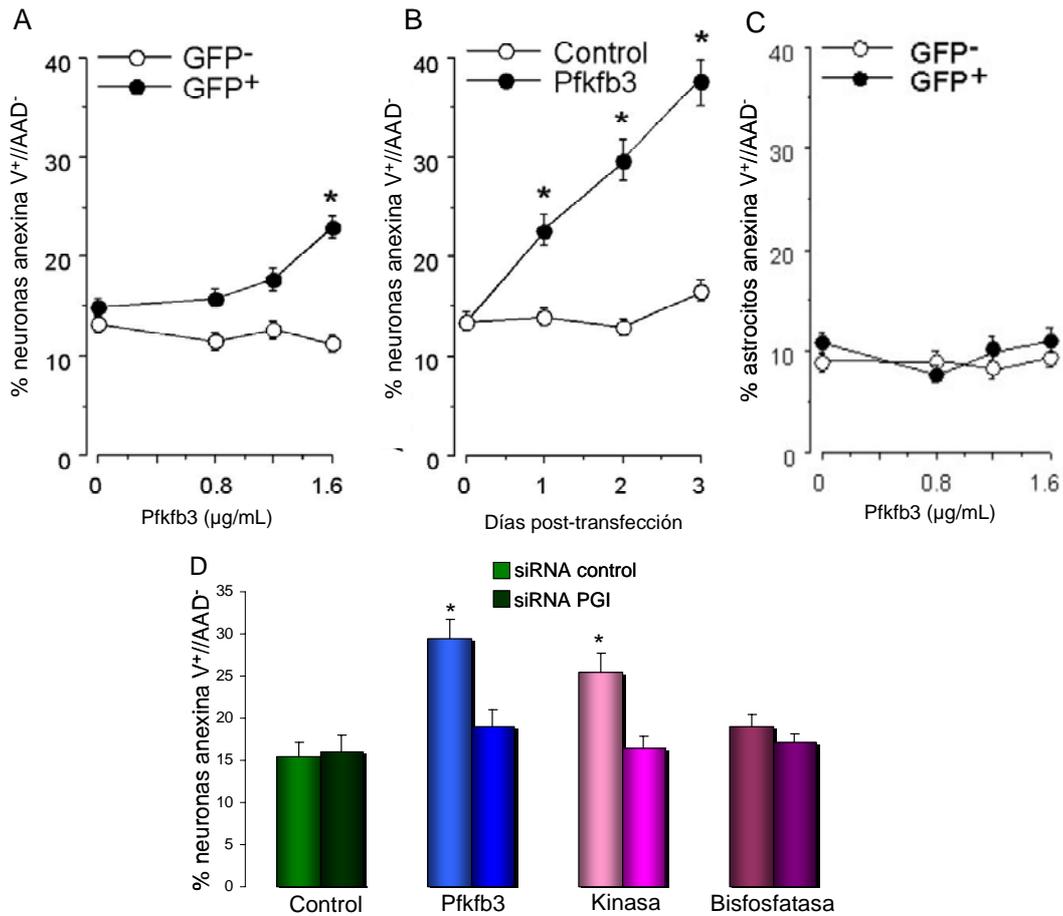


**FIGURA 16. Apoptosis producida por Pfkfb3.** Las neuronas se transfectaron durante 3 días con los siRNA, mientras que las transfecciones con pIRES2.eGFP se realizaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se determinó el porcentaje de neuronas anexina V<sup>+</sup>/7AAD<sup>-</sup>. \*p<0,05 con respecto al control.

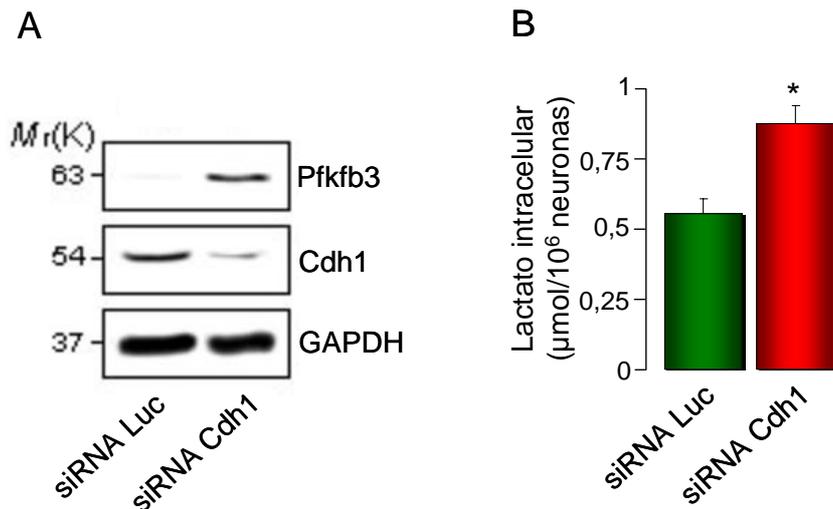


**FIGURA 17. Vía de las caspasa a través de la cual Pfkfb3 produce apoptosis en neuronas.** Las células control se transfectaron 24 horas antes de la recolección de las muestras con el plásmido pIRES2.eGFP vacío, mientras que en el resto de condiciones, las neuronas se transfectaron con el cDNA de Pfkfb3. El tratamiento con los inhibidores de caspasa se realizó 6 horas después de la transfección a una concentración de 50 μM. La caspasa sobre la cual ejercen su función estos inhibidores se encuentra en la tabla VI de material y métodos. \*p<0,05 con respecto al control.

Por otro lado, este efecto es dependiente de la concentración de cDNA de Pfkfb3 (Fig. 18A), así como del tiempo de incubación (Fig. 18B). Aunque estos resultados descartan la posibilidad de un efecto tóxico inespecífico, nos propusimos confirmarlo mediante la expresión del dominio kinasa y del bisfosfatasa de la Pfkfb3. Así, la sobre-expresión del dominio kinasa, pero no del bisfosfatasa, reprodujo el efecto de la Pfkfb3 sobre la apoptosis neuronal (Fig. 18D). Finalmente, con objeto de corroborar estos resultados, nos propusimos estudiar si la inhibición de Cdh1, que induce una acumulación de Pfkfb3 similar a la producida por sobre-expresión de Pfkfb3 (Fig. 16), era capaz de inducir muerte neuronal. Como se observa en la Fig. 16, la interferencia del RNA de Cdh1 también indujo un aumento de la proporción de neuronas anexina V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>, lo que sugiere muerte celular. Es más, la muerte neuronal producida por la inhibición de Cdh1 se previno, aunque solo de forma parcial, mediante la co-interferencia en el RNA de la Pfkfb3 (Fig. 16), lo que demuestra la intervención de Pfkfb3 en la muerte neuronal. Finalmente, tanto la acumulación de Pfkfb3 como el incremento de la concentración de lactato producido por el silenciamiento de Cdh1, se observó también en neuronas vivas, es decir, anexina V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup> (Fig. 19). Este resultado demuestra que el incremento de la glucólisis al inhibir Cdh1 precede la muerte neuronal.

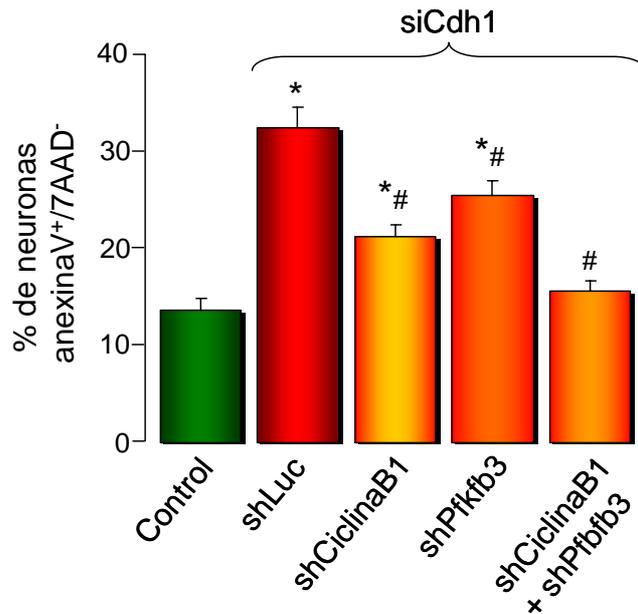


**FIGURA 18. Apoptosis producida por la sobreexpresión de Pfkfb3 y sus dominios.** (A) La transfección de las neuronas se realizó durante 24 horas con concentraciones crecientes de Pfkfb3. (B) Las neuronas se transfectaron con el cDNA de Pfkfb3 durante 24 a 72 horas. (C) Los astrocitos se transfectaron con concentraciones crecientes del cDNA de Pfkfb3 durante 24 horas, transcurridas las cuales se determinó el porcentaje de astrocitos anexina V<sup>+</sup>/7AAD<sup>-</sup> (D) Todas las neuronas se transfectaron con el siRNA contra PGI. A las 48 horas de transfección con el siRNA frente a PGI, las neuronas se transfectaron con los cDNAs de Pfkfb3 completa, de su dominio kinasa y de su dominio bisfosfatasa. Transcurridas 24 horas se determinó el porcentaje de neuronas anexina V<sup>+</sup>/7AAD<sup>-</sup>. Todas las determinaciones de apoptosis se realizaron en la población GFP<sup>+</sup>. \*p<0,05 con respecto al control.



**FIGURA 19. Apoptosis y glucolisis en neuronas anexina V y 7-AAD negativas que tienen silenciado Cdh1.** Las neuronas se transfectaron durante 3 días con el siRNA contra Cdh1 o con el siRNA contra la luciferasa. Transcurridos estos 3 días las neuronas se separaron de las placas y se incubaron en PBS en presencia de anexina V y de 7-AAD y, posteriormente, se separaron por citometría de flujo atendiendo a la no expresión de estos dos marcadores. Con la población de neuronas anexina V<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup> se realizaron experimentos de transferencia tipo Western (A) y se determinó el lactato intracelular (B). \*p<0,05 con respecto al control (siRNA Luc).

Hay que indicar aquí que en un estudio previo se ha demostrado que la inhibición de Cdh1 induce muerte neuronal apoptótica a través de un mecanismo que implica, de forma parcial, la acumulación de ciclina B1 (Almeida y col., 2005). Así, podría ser posible que ambas vías, es decir, la Pfkfb3 y la ciclina B1, estén implicadas en la apoptosis causada por inhibición de Cdh1. Para dilucidar esta cuestión decidimos interferir en el RNA de ciclina B1 y en el de Pfkfb3 con objeto de prevenir la acumulación de ambos en neuronas en las que Cdh1 se inhibía. Como se muestra en la Fig. 20, la interferencia en ciclina B1 o la interferencia en Pfkfb3 previnieron un 50% cada uno la muerte neuronal por inhibición de Cdh1. Sin embargo, la interferencia de ambas a la vez previno completamente la muerte neuronal (Fig. 20).

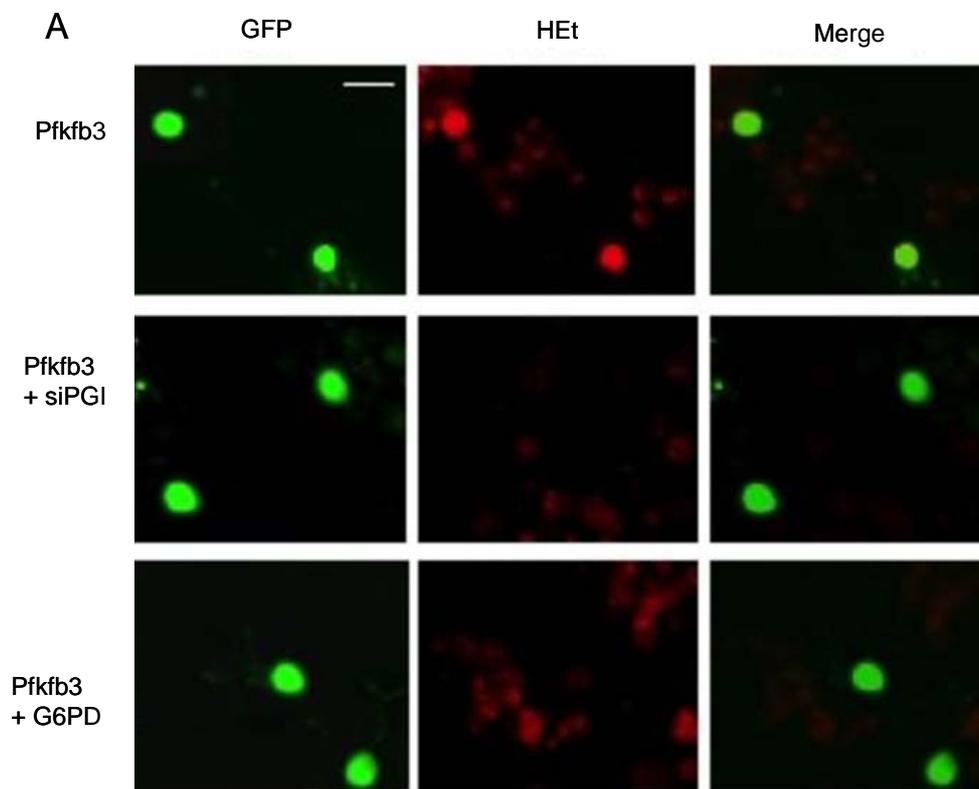


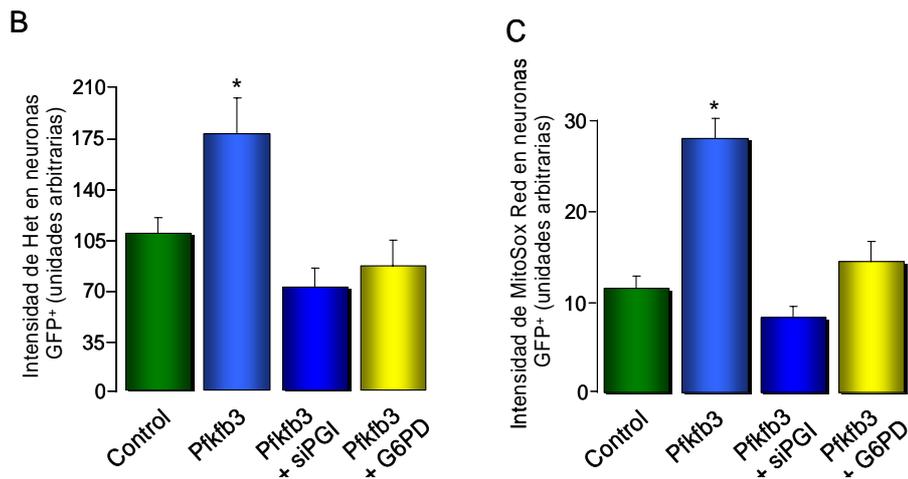
**FIGURA 20. Apoptosis producida por el silenciamiento de Cdh1.** Todas las neuronas se transfectaron durante 3 días. Como control, las neuronas se transfectaron con el siRNA frente a la luciferasa y con el vector pSUPERneo.gfp también contra la luciferasa. Las neuronas en las que se silenció exclusivamente Cdh1, también se transfectaron con el vector pSUPERneo.gfp contra la luciferasa. En el resto de condiciones, las neuronas se transfectaron con el siRNA frente a Cdh1 y con los vectores pSUPERneo.gfp frente a ciclina B1, a Pfkfb3 o frente a ambas. La apoptosis se determinó sobre la población GFP<sup>+</sup>. \*p<0,05 con respecto al control. #p<0,05 con respecto a siCdh1.

Por otro lado, conviene resaltar que la muerte neuronal apoptótica causada por la sobre-expresión de la Pfkfb3 se previno completamente mediante el RNAi de PGI; y la muerte producida por inhibición de Cdh1 se previno parcialmente mediante el RNAi de PGI. Estos resultados son consistentes con la idea de que Cdh1 protege las neuronas de la muerte previniendo la acumulación de ciclina B1 (Almeida y col., 2005) y de Pfkfb3 (esta Memoria). Por lo tanto, con objeto de descartar mecanismos múltiples en los experimentos subsecuentes, decidimos emplear únicamente la sobre-expresión de Pfkfb3 como modo de elección para estimular glucólisis en neuronas.

## 7. Pfkfb3 desequilibra el balance entre glucolisis y ciclo de las pentosas-fosfato, generando estrés oxidativo

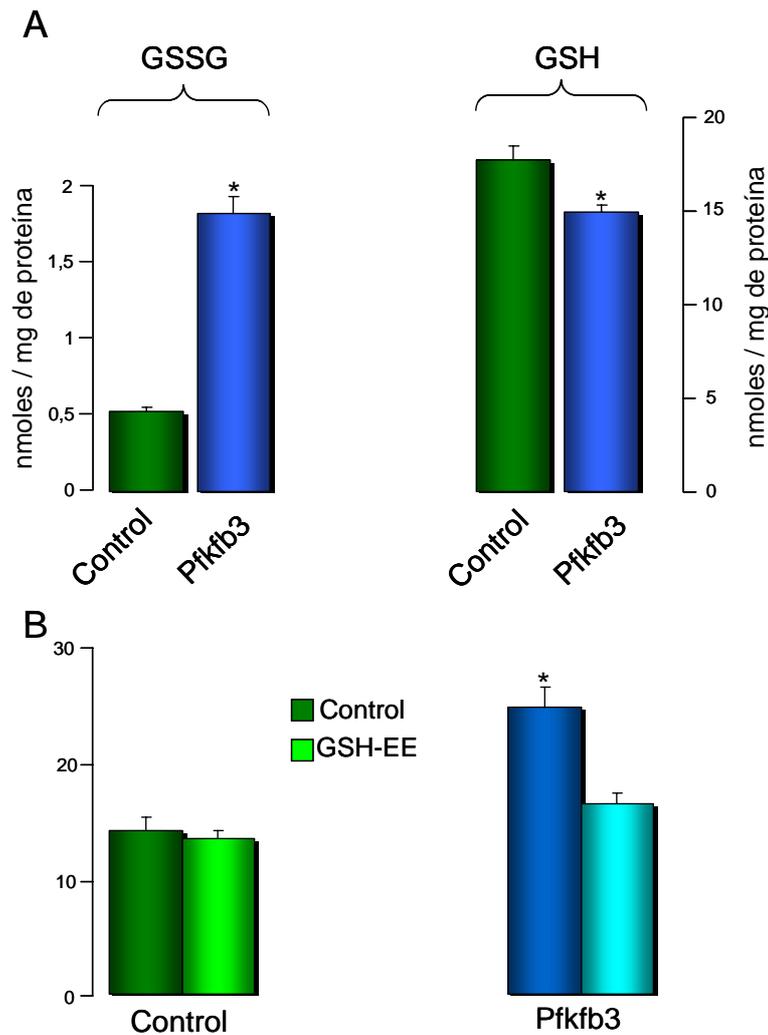
Con objeto de dilucidar el posible mecanismo responsable de la muerte neuronal apoptótica por sobreexpresión de Pfkfb3, decidimos estudiar, en primer lugar, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Así, la sobre-expresión de Pfkfb3 indujo un aumento de ROS, determinado mediante la oxidación de hidroetidina (Fig. 21A y B) y MitoSox (Fig. 21C).





**FIGURA 21. Relación entre el incremento glucolítico producido por Pfkfb3 y el estrés oxidativo neuronal.** Las neuronas se transfectaron con los siRNA durante 3 días. Por otra parte, el resto de transfecciones se realizaron 24 horas antes de la realización de los experimentos. (A) Muestra la fluorescencia roja emitida por la etidina al unirse la dihidroetidina a ROS, mientras que (B) muestra la cuantificación de dicha fluorescencia en, al menos, 50 fotografías de cada situación. (C) muestra la intensidad de fluorescencia, medida por citometría de flujo, que emite el compuesto MitoSox-Red™ cuando se une al anión superóxido en la mitocondria. \* $p < 0,05$  con respecto al control.

Por otro lado, este mismo tratamiento produjo un notable incremento en la concentración de glutatión oxidado (GSSG) y disminución del reducido (GSH) (Fig. 22A). Estos resultados indican que la expresión de Pfkfb3 induce estrés oxidativo. Así, decidimos investigar si la muerte neuronal por sobreexpresión de Pfkfb3 se prevenía mediante la incubación en presencia de glutatión etil éster, una forma de glutatión que atraviesa la membrana plasmática. Como se observa en la Fig. 22B, el tratamiento de las neuronas con este compuesto previno por completo la muerte neuronal producida por Pfkfb3. En su conjunto, estos resultados nos permiten afirmar que la expresión de Pfkfb3 produce muerte neuronal apoptótica por estrés oxidativo.

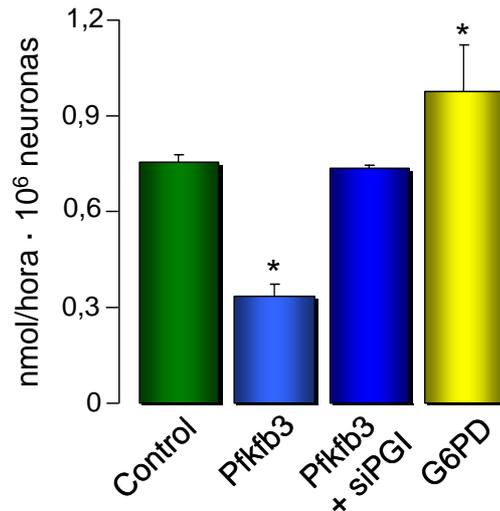


**FIGURA 22. Efecto producido por Pfkfb3 sobre la concentración de glutatión neuronal.** (A) Las neuronas se transfectaron durante 24 horas con pIRES2.eGFP (control) o con el cDNA Pfkfb3. Transcurrido este tiempo, las neuronas se separaron por citometría de flujo atendiendo a la expresión de la proteína verde fluorescente GFP<sup>+</sup> y, en estas neuronas, se determinó la concentración de glutatión reducido (GSH) y de glutatión oxidado (GSSG). (B) Las neuronas se transfectaron de igual modo que en la figura A y, 6 horas después de la transfección, se trataron con glutatión etil éster (GSH-EE; Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 mM. Transcurridas 24 horas desde la transfección se determinó la apoptosis en las neuronas GFP<sup>+</sup>. \*p<0,05 con respecto al control.

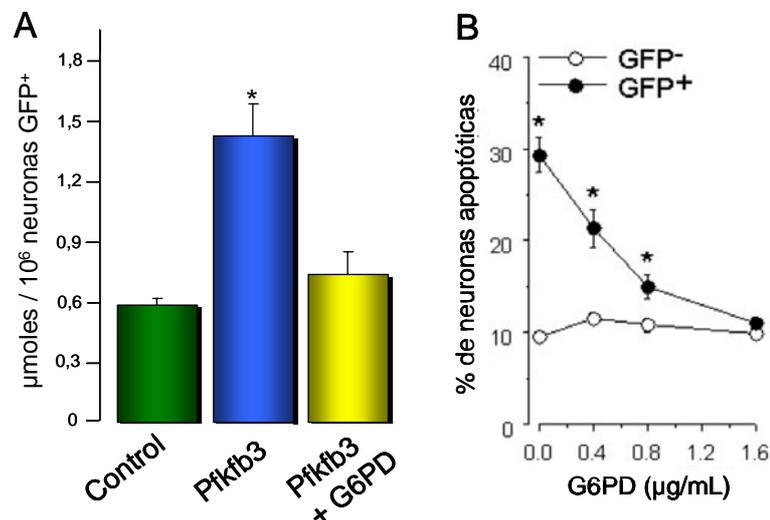
Dado que Pfkfb3 podría desencadenar estrés oxidativo a través de un mecanismo independiente de su efecto estimulador de la glucólisis, a continuación nos propusimos investigar si el RNAi de PGI era capaz de prevenir la producción de ROS mediada por Pfkfb3. Como se observa en las Figs. 21A, B y C, el siRNA de PGI previno completamente la oxidación de dihidroetidina y de MitoSox. Por tanto, la formación de

ROS causada por sobre-expresión de Pfkfb3 se debe al efecto estimulador de la glucolisis.

Como se sabe, la glucolisis y el ciclo de las pentosas-fosfato están interconectadas a nivel de la G6P. Por otro lado, se conoce que una de las funciones del ciclo de las pentosas-fosfato es la regeneración de NADPH(H<sup>+</sup>), que a su vez es necesario para regenerar GSH a partir de GSSG a través de la reacción catalizada por la glutathion reductasa (Ben-Yoseph y col., 1996; Garcia-Nogales y col., 2003). Por estos motivos nos planteamos la posibilidad de que el aumento de ROS por sobreexpresión de Pfkfb3 podría ser consecuencia de una disminución en la velocidad del ciclo de las pentosas-fosfato promovida por la estimulación de la glucolisis. Para dilucidar esta cuestión decidimos determinar la velocidad del ciclo de las pentosas-fosfato mediante la medida de la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de [1-<sup>14</sup>C]- y [6-<sup>14</sup>C]-glucosa, un método ampliamente utilizado para este fin (Hothersall y col., 1979; Larrabee 1990). Los resultados mostrados en la Fig. 22 revelan que la expresión de Pfkfb3 disminuyó un 50%, aproximadamente, la velocidad del ciclo de las pentosas-fosfato. Dado que la G6PD es la enzima limitante de la velocidad del ciclo de las pentosas fosfato, a continuación decidimos investigar si este efecto se podría prevenir mediante la co-sobre-expresión de G6PD. Así, resultados anteriores de nuestro grupo han demostrado que la sobre-expresión de G6PD es suficiente para estimular el ciclo de las pentosas fosfato (Garcia-Nogales y col., 2003). Como se observa en la Fig. 23, la disminución de la velocidad del ciclo de las pentosas fosfato causado por la sobre expresión de Pfkfb3 se previno al co-expresar G6PD; es más, este efecto se previno, igualmente, mediante el RNAi de PGI. En su conjunto, estos resultados indican que la sobre-expresión de Pfkfb3 incrementa la velocidad de la glucolisis, pero induce una disminución concomitante de la velocidad del ciclo de las pentosas fosfato. Ello produce estrés oxidativo que conlleva a la muerte neuronal por apoptosis. Del mismo modo, la cotransfección de las neuronas con Pfkfb3 y con concentraciones crecientes de G6PD, permitió corroborar que cuanto mayor era la cantidad de G6PD menor era la apoptosis producida por Pfkfb3 (Fig. 24).



**FIGURA 23. Actividad de la PPP.** Todas las neuronas se transfectaron con el siRNA frente a la luciferasa excepto aquellas que se transfectaron contra el siRNA contra PGI durante 3 días. Las transfecciones con pIRES2.eGFP vacío, con Pfkfb3 y G6PD se realizaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las neuronas se separaron por citometría de flujo atendiendo a la expresión de la proteína verde fluorescente GFP y, en dichas neuronas, se determinó la diferencia entre la oxidación de la [1-<sup>14</sup>C]-glucosa y la [6-<sup>14</sup>C]-glucosa, lo que permite obtener una medida fiable de la actividad de la PPP. \*p<0,05 con respecto al control.



**FIGURA 24. Relación entre la glucólisis y la PPP.** (A) Las neuronas se transfectaron durante 24 horas el día 5 de cultivo *in vitro*. Transcurrido este tiempo, se determinó la concentración de lactato intracelular de las neuronas GFP<sup>+</sup> separadas por citometría de flujo. (B) Las neuronas se cotransfectaron con Pfkfb3 y con concentraciones crecientes de G6PD durante 24 horas el día 5 de cultivo *in vitro*. Transcurrido este tiempo se determinó la apoptosis de las neuronas GFP<sup>+</sup>. \*p<0,05 con respecto al control.

## DISCUSIÓN

**5**



## **Sinopsis**

Bien es sabido desde hace décadas que el cerebro es, en relación a su masa, uno de los tejidos que más glucosa y oxígeno consumen (Roy y Sherrington 1890; Sokoloff y col., 1977; Magistretti y Pellerin 1999b). La energía necesaria para re-polarizar la membrana plasmática durante la neurotransmisión explica la estricta dependencia de las neuronas de un continuo y eficaz suministro de ATP, que realiza fundamentalmente la mitocondria. Así, durante una deficiencia mitocondrial las neuronas no son capaces de reactivar la velocidad de la glucolisis como un mecanismo alternativo generador de ATP. Esta incapacidad se conoce desde hace tiempo (Pauwels y col., 1985), aunque el mecanismo ha permanecido desconocido hasta ahora. Los astrocitos, en cambio, disponen del resorte adecuado para re-activar la velocidad de la glucolisis ante una crisis bioenergética mitocondrial, que le proporciona suficiente ATP como para prevenir el colapso del potencial de membrana mitocondrial y muerte (Almeida y col., 2001).

Nuestro laboratorio describió, en 2004, un posible mecanismo que explicaría la capacidad de los astrocitos de reactivar la glucolisis ante un fallo mitocondrial. A través del incremento en AMP producido por la inhibición mitocondrial (Cidad y col., 2004), la proteína quinasa dependiente de AMP (AMP quinasa) activa, probablemente por fosforilación, la Pfkfb3, que es la isoforma mayoritaria de la Pfkfb en cerebro, y esto es suficiente para incrementar rápidamente la velocidad de la glucolisis y promover supervivencia (Almeida y col., 2004). Ahora, en esta Memoria describimos que las neuronas carecen de este “acoplamiento metabólico” porque no expresan la proteína Pfkfb3, así como ninguna de las isoformas de la Pfkfb, aunque sí sus respectivos RNA mensajeros. Es más, demostramos que la proteína Pfkfb3 está sujeta a una continua

degradación proteolítica por ubiquitinación, promovida por la E3 ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1. No sabemos cómo se degradan (si es que lo hacen) las otras tres isoformas, pero sí mostramos que este mecanismo es suficiente para explicar la escasa velocidad glucolítica neuronal en comparación con sus células vecinas los astrocitos. En efecto, éstos expresan bajos niveles de Cdh1 y escasa actividad APC/C-Cdh1, lo que les permite acumular Pfkfb3 y tener una robusta glucolisis.

Así, la glucosa no parece ser el sustrato metabólico bioenergético por excelencia para las neuronas. Según nuestros resultados, las neuronas utilizan la glucosa preferentemente para oxidarla a través del ciclo de las pentosas-fosfato, y así ayudar a regenerar el glutathione. Esto explica que, al incrementar Pfkfb3 en neuronas, bien sea por su acumulación tras inhibición de APC/C-Cdh1, bien por sobre-expresión directa del cDNA de la Pfkfb3, se estimule la velocidad de la glucolisis y disminuya la velocidad del ciclo de las pentosas-fosfato, generando estrés oxidativo y muerte neuronal.

Cabe preguntarse, pues, si las neuronas están empleando la glucosa preferentemente para protegerse del estrés oxidativo ¿de dónde obtienen su energía? El trabajo de varios laboratorios ha venido a demostrar que el cerebro (McIlwain 1953; Fernandez y Medina 1986) y en especial las neuronas (Vicario y col., 1991; Pellerin 2003) son excelentes consumidoras de lactato. Es más, el consumo de lactato como sustrato energético neuronal parece estar acoplado a la actividad glutamatérgica (Pellerin y col., 2007). Así, a través de un mecanismo propuesto por Magistretti y colaboradores, la recaptación de glutamato del espacio sináptico, que transcurre por un co-transporte paralelo con Na<sup>+</sup> por parte de los astrocitos, gasta energía en expulsar el Na<sup>+</sup> de estas células. El gasto de energía estaría acoplado, probablemente a través de la AMP quinasa (Almeida y col., 2004), a una elevada glucolisis hasta lactato. Así, los astrocitos serían los suministradores de lactato para las neuronas, de forma que, como mecanismo generador de ATP, los primeros emplearían preferentemente la glucolisis mientras que los segundos la mitocondria. De ser así, el elevado consumo de glucosa y oxígeno que desde hace décadas se sabe que realiza el cerebro debe ser un proceso dissociado entre los astrocitos (que consumirían la glucosa) y las neuronas (que darían cuenta del consumo de oxígeno). De este modo, la regulación de la glucolisis neuronal por APC/C-Cdh1 descrita en esta Memoria podría estar sujeta a una modulación fisio(pato)lógica a través de mecanismos que ahora requieren investigación.

## **1. Caracterización de la expresión de los RNA mensajeros y de las proteínas de la isoformas de la Pfkfb en neuronas y astrocitos.**

En esta Memoria confirmamos que, a nivel de RNA mensajero, Pfkfb3 es la isoforma más abundante tanto en neuronas como en astrocitos. Sin embargo, a nivel proteico, los astrocitos expresan profusamente Pfkfb3, mientras que las neuronas lo hacen de un modo prácticamente indetectable. Es interesante recordar que esta isoforma de la Pfkfb es, además, la isoforma cuya relación de actividades kinásica frente a bisfosfatásica es considerablemente mayor (Okar y col., 2001). Ninguna de las otras isoformas de la Pfkfb, cuyas relaciones de actividades kinásica/bisfosfatásica son de 1, aproximadamente, se expresa en neuronas, pero sí lo hacen en astrocitos, aunque en inferior proporción que la Pfkfb3. En su conjunto, estos resultados nos inducen a pensar que la expresión de Pfkfb3 en astrocitos debe asociarse a actividad kinásica y, por lo tanto, a incrementos en la concentración del efector alostérico F2,6P2.

Por otra parte, también hemos caracterizado el patrón de expresión de las 8 variantes alternativas de la Pfkfb3, ya descritas por otros autores (Watanabe y col., 1997). De este modo, hemos demostrado que, tanto en neuronas como en astrocitos, los RNA mensajeros más abundantes son los de las variantes alternativas RB2K3 y RB2K6, siendo esta última homóloga a la variante alternativa uPFK-2 de humano, que es inducida por insulina (Riera y col., 2002), progesterona (Hamilton y col., 1997) e hipoxia (Minchenko y col., 2002; Obach y col., 2004). Para estudiar la expresión proteica de estas dos variantes alternativas diseñamos y generamos en nuestro laboratorio un anticuerpo para reconocerlas. Con éste demostramos que solamente los astrocitos expresan de manera detectable dichas variantes alternativas. Estos resultados nos permiten afirmar que, aunque tanto las neuronas como los astrocitos expresan los RNA mensajeros de la Pfkfb3, sólo los astrocitos expresan la proteína. Esto podría

explicar por qué estos dos tipos de células responden de diferente manera frente a la inhibición de la cadena transportadora de electrones (Almeida y col., 2001).

## **2. Regulación de la estabilidad de la proteína Pfkfb3 por APC/C-Cdh1**

La expresión del RNA mensajero de la Pfkfb3, pero no de su proteína, nos indujo a plantear la idea de una posible regulación de la estabilidad de la misma a nivel post-transcripcional en neuronas. Hay que mencionar que, en experimentos realizados con la línea celular C2C12, otros autores han comprobado que los niveles de uPFK-2 disminuyen durante la miogénesis, aparentemente por degradación proteica (Riera y col., 2003). Por estos motivos decidimos investigar si la Pfkfb3 estaba sujeta a degradación proteosómica en las neuronas, y los resultados obtenidos con los inhibidores del proteosoma, que mostraron la acumulación de formas ubiquitinadas de Pfkfb3, nos lo confirmaron. Decidimos, así, intentar identificar el mecanismo responsable de la degradación de Pfkfb3 en neuronas. Analizando la secuencia de aminoácidos encontramos que el motivo KEN en la posición 142 está presente en la isoforma Pfkfb3, pero no en las demás. El motivo KEN proporciona inestabilidad proteica, ya que es reconocido por Cdh1 (Pfleger y Kirschner 2000), un cofactor de la E3 ubiquitina ligasa APC/C implicada en la regulación de proteínas mitóticas (Almeida y col., 2005; Cuende y col., 2008; Maestre y col., 2008). De hecho, resultados previos de nuestro laboratorio, en colaboración con el Prof. Sergio Moreno (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca), han demostrado que Cdh1 se expresa profusamente en neuronas (Almeida y col., 2005). En efecto, la interferencia en la expresión de Cdh1 en neuronas mediante la técnica del RNA de interferencia (RNAi) confirmó la estabilización de Pfkfb3. Es más, mediante mutagénesis dirigida (<sup>142</sup>KEN a <sup>142</sup>AAA) demostramos que el motivo KEN de Pfkfb3 es necesario para conferir inestabilidad proteica a Pfkfb3 en neuronas. Los astrocitos, sin embargo, expresan Pfkfb3 porque Cdh1, y la actividad del complejo APC/C-Cdh1 son muy bajas. De

hecho, la sobre-expresión de Cdh1 induce degradación de Pfkfb3 en estas células. En su conjunto, estos resultados demuestran que la proteína Pfkfb3 es inestable en neuronas porque se degrada por la vía ubiquitina-proteosoma a través de APC/C-Cdh1.

No somos conscientes de la existencia de mecanismo alguno que, de forma similar, controle la velocidad de la glucolisis. No obstante, hay que indicar que la expresión transcripcional de la Pfkfb3 aumenta, en células de glioblastoma, promovida por el factor de transcripción HIF-1 (Obach y col., 2004), así como tras el tratamiento de monocitos con agentes pro-inflamatorios como lipopolisacárido (Chesney y col., 1999), o tras el tratamiento de células HeLa con ésteres de forbol (Navarro-Sabate y col., 2001).

Por otro lado, hay que indicar que la Pfkfb3 está sujeta a cambios de actividad por fosforilación/desfosforilación. Así, la fosforilación por AMPK en la Ser<sup>461</sup> aumenta la actividad kinásica de la enzima en monocitos activados (Marsin y col., 2002) y en células tumorales Cos-7 (Bando y col., 2005), mientras que la fosforilación por parte de PKA y PKC parece no tener efecto alguno (Tominaga y col., 1997). Así, es posible que la acumulación de Pfkfb3 producida en neuronas por inhibición de Cdh1, o por la sobre-expresión de Pfkfb3, no sea suficiente para promover cambios en su actividad. Por ese motivo, nuestro siguiente objetivo consistió en dilucidar si los cambios de Pfkfb3 en neuronas se acompañaban de cambios en la velocidad de la glucolisis.

### **3. Regulación de la glucolisis por la vía APC/C-Cdh1-Pfkfb3**

Nuestro siguiente objetivo consistió en investigar si la inestabilidad de la Pfkfb3 determina la baja velocidad glucolítica neuronal. Para ello realizamos dos aproximaciones, i) inhibición de Cdh1, y ii) sobre-expresión de Pfkfb3. Decidimos emplear varios métodos para estimar la velocidad de la glucolisis. Tradicionalmente, la determinación de la concentración de lactato (intra- y/o extracelular), se emplea como indicador de la actividad glucolítica. Sin embargo, este dato, por sí mismo, puede resultar ambiguo si la mitocondria utiliza cuantitativamente el piruvato procedente de la

glucosa con fines bioenergéticos. Por otro lado, la concentración de lactato intracelular puede ser únicamente el reflejo de la concentración de este metabolito en el estado estacionario, por lo que se podría infraestimar modificaciones relevantes en la velocidad de la glucolisis. Así, decidimos emplear varios métodos para estimar la velocidad del consumo de glucosa por la vía glucolítica. De los resultados obtenidos se desprende que la determinación de la concentración intracelular de lactato indica aumentos, del doble aproximadamente, en respuesta a la inhibición de Cdh1 o a la sobre-expresión de Pfkfb3 en neuronas. Sin embargo, la determinación de la velocidad de incorporación del carbono-6 de la glucosa en lactato mediante el método radiométrico parece más sensible, dado que refleja aumentos en la velocidad de la vía metabólica de unas 5 veces tras los mismos tratamientos.

Dado que la interconversión piruvato  $\longleftrightarrow$  lactato en neuronas y en astrocitos depende de qué isoforma de lactato deshidrogenasa se expresa mayoritariamente en estos dos tipos celulares, (Laughton y col., 2007), decidimos emplear un método alternativo para estimar las posible diferencias de la velocidad de la glucolisis entre estos dos tipos celulares. Así, el método de la deshidratación del carbono-3 de la glucosa, formando  $^3\text{H}_2\text{O}$ , nos pareció el más apropiado, ya que este proceso se lleva a cabo en la reacción catalizada por la aldolasa. Por lo tanto, la velocidad de la formación de  $^3\text{H}_2\text{O}$  a partir de  $[3\text{-}^3\text{H}]$ glucosa refleja con fidelidad la velocidad del flujo de la glucolisis en la reacción catalizada por la fosfofructokinasa-1, ya que es la reacción inmediatamente anterior a la aldolasa que está regulada. En efecto, empleando este método obtuvimos datos que confirman que la velocidad de la glucolisis en los astrocitos es unas 5 veces superior al de las neuronas en condiciones normales.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que los astrocitos realizan glucolisis a una velocidad de aproximadamente 5 veces mayor que las neuronas. Además, la simple expresión de Pfkfb3 en neuronas, tanto por inhibición de Cdh1 como por sobre-expresión de Pfkfb3, es suficiente como para incrementar en unas 5 veces la velocidad de la glucolisis, alcanzando así valores similares a los astrocitos. Por lo tanto, podemos sugerir que APC/C-Cdh1 es un regulador negativo de la glucolisis neuronal porque desestabiliza Pfkfb3.

#### **4. Pfkfb3 y neuroprotección transitoria frente crisis bioenergética**

Resultados anteriores de nuestro grupo han determinado que, tras inhibir la cadena respiratoria mitocondrial con óxido nítrico, los astrocitos responden incrementando su velocidad de la glucólisis (Bolanos y col., 1994; Almeida y col., 2001). Es más, el aumento glucolítico mantiene constantes las concentraciones celulares de ATP, que contribuyen decisivamente a prevenir el colapso del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y la muerte celular por apoptosis (Almeida y col., 2001). Sin embargo, el tratamiento de las neuronas con idénticas concentraciones de óxido nítrico, así como de otras toxinas mitocondriales como cianuro u oligomicina, induce una dramática caída de las concentraciones celulares de ATP, desencadenando caída del  $\Delta\psi_m$  y muerte apoptótica (Brorson y col., 1999; Almeida y col., 2001; Almeida y col., 2004). Por lo tanto, en esta Memoria nos propusimos investigar si el incremento en la velocidad de la glucólisis causado por la sobre-expresión de la Pfkfb3 en neuronas podría tener efecto neuroprotector.

Para ello, en primer lugar sobre-expresamos, empleando bajas concentraciones de cDNA, la Pfkfb3 en neuronas y, seguidamente, las incubamos en presencia de un donador de óxido nítrico capaz de inhibir la cadena respiratoria mitocondrial (Almeida y col., 2001). En ausencia de Pfkfb3, el óxido nítrico produjo el colapso del  $\Delta\psi_m$  y muerte apoptótica; sin embargo, la expresión de Pfkfb3 previno completa-, aunque transitoriamente, el colapso del  $\Delta\psi_m$  y apoptosis. Así, con estos resultados confirmamos la importancia de la glucólisis en citoprotección frente a una crisis bioenergética.

No obstante, nos sorprendió la transitoriedad del efecto neuroprotector de la Pfkfb3. En efecto, para los experimentos realizados en esta sección nos vimos obligados emplear bajas concentraciones del cDNA de la Pfkfb3; así, expresado en concentraciones capaces de acumular una cantidad de proteína similar a la encontrada en los astrocitos, la Pfkfb inducía muerte neuronal.

## **5. La expresión de Pfkfb3 en neuronas induce apoptosis**

La expresión de Pfkfb3 en neuronas, si bien protege de forma transitoria cuando se expresa en bajas concentraciones según se ha explicado en la sección anterior, induce muerte. La muerte es, aparentemente, por apoptosis, puesto que aumenta la proporción de neuronas anexina V-positivas (dentro de la subpoblación 7-AAD-negativa); no obstante, lo corroboramos mediante el uso de inhibidores de caspasas. Es más, el efecto es dependiente de las dosis del cDNA de la Pfkfb3 empleado, y del tiempo de incubación, siendo mayor la muerte neuronal apoptótica cuanto mayor es el tiempo. Estos resultados descartan la posibilidad de que se trate de un mero efecto inespecífico, aunque quisimos confirmarlo de la siguiente manera. Por un lado, la expresión del dominio kinasa, pero no el bisfosfatasa, fue capaz de reproducir la toxicidad de la Pfkfb3; y, por otro lado, la interferencia del RNA de Cdh1, que provoca aumento de Pfkfb3, también indujo muerte neuronal que se previno mediante la co-interferencia en el RNA de la Pfkfb3. Finalmente, desarrollamos una herramienta capaz de interferir la glucólisis en el paso anterior al catalizado por la Pfk1. Esta herramienta la validamos mediante un exhaustivo estudio de las concentraciones de los metabolitos G6P, F6P, F1,6P2 y lactato, así como de la velocidad de la glucólisis. Nuestros resultados demuestran que la muerte neuronal apoptótica causada por la sobre-expresión de la Pfkfb3 o por la inhibición de Cdh1 se previno mediante el RNAi de PGI. Estos resultados nos permite afirmar que la expresión de la Pfkfb3 en neuronas a concentraciones capaces de igualar la de los astrocitos induce muerte apoptótica.

Hay que indicar aquí que en un estudio previo se ha demostrado que la inhibición de Cdh1 induce muerte neuronal apoptótica a través de un mecanismo que implica, de forma parcial, la acumulación de ciclina B1 (Almeida y col., 2005). Así, es posible que la muerte neuronal causada por inhibición de Cdh1 se deba, no solo a la acumulación de Pfkfb3, sino también a la acumulación de ciclina B1. Para dilucidar esta cuestión decidimos investigar qué vía (Pfkfb3 o ciclina B1) estaba implicada en la apoptosis causada por inhibición de Cdh1 en nuestras condiciones experimentales. Los

resultados nos revelaron que ambas vías participan en un 50% aproximadamente cada una. Puesto que el estudio del mecanismo apoptótico a través de la vía ciclina B1 se aleja de los objetivos de la presente Memoria, decidimos continuar mediante el uso del cDNA completo de la Pfkfb3.

## **6. Pfkfb3 desequilibra el balance entre glucolisis y ciclo de las pentosas-fosfato, generando estrés oxidativo**

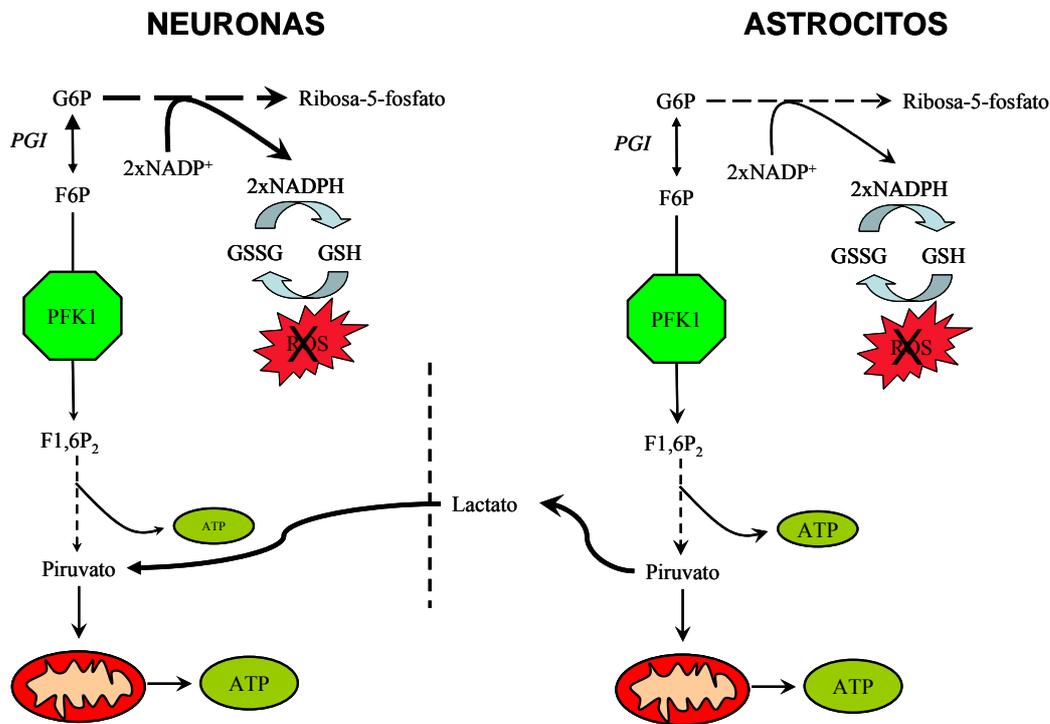
Buscando un posible mecanismo causante de la muerte neuronal apoptótica por sobre-expresión de Pfkfb3 encontramos signos de estrés oxidativo. Así, Pfkfb3 indujo aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), determinadas mediante oxidación de hidroetidina y MitoSox, así como oxidación de glutatión. Por otro lado, la muerte neuronal por expresión de Pfkfb3 se previno en presencia de glutatión etil éster. En su conjunto, estos resultados sugieren la posibilidad que la expresión de Pfkfb3 produce muerte neuronal por estrés oxidativo. Es más, el aumento de la producción de ROS se previno mediante la inhibición de PGI, lo que sugiere fuertemente que está producido como consecuencia del efecto inductor de la Pfkfb3 sobre la glucolisis neuronal.

La glucolisis y el ciclo de las pentosas-fosfato, como es sabido, son dos vías metabólicas que están interconectadas a nivel de la G6P, y la función del ciclo en la regeneración de NADPH(H<sup>+</sup>), necesario a su vez para regenerar glutatión, es también bien conocida (Baquer y col., 1988). Así, hay numerosos antecedentes que demuestran la importancia del ciclo de las pentosas-fosfato en la protección celular frente al estrés oxidativo, precisamente por su capacidad de regenerar glutatión (Ben-Yoseph y col., 1996; Garcia-Nogales y col., 1999; Kussmaul y col., 1999; Delgado-Esteban y col., 2000; Garcia-Nogales y col., 2003). Estos antecedentes nos estimularon a plantear la posibilidad de que el aumento de la vía glucolítica por sobre-expresión de Pfkfb3 se podría ver acompañada de una reducción concomitante en la velocidad del ciclo de las pentosas-fosfato. Para dilucidar esta cuestión decidimos determinar la velocidad del ciclo de las pentosas-fosfato mediante la medida de la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de [1-<sup>14</sup>C]- y [6-<sup>14</sup>C]glucosa, un método ampliamente utilizado para este fin (Hothersall y

col., 1979; Larrabee 1990). Nuestros resultados revelan que la expresión de Pfkfb3 disminuye en un 50%, aproximadamente, la velocidad del ciclo de las pentosas-fosfato, y este efecto se previene al co-expresar la enzima limitante del ciclo de las pentosas-fosfato, G6PD. Es más, tanto la producción de ROS como la muerte neuronal apoptótica causada por la sobre-expresión de Pfkfb3 se previnieron, asimismo, por co-expresión de G6PD. Otros autores han observado, en la línea celular MvuL1 que el descenso en los niveles de F2,6P<sub>2</sub> promovido por expresión del dominio bisfosfatasa de la Pfkfb3 se acompaña del mantenimiento de las concentraciones de NADPH(H<sup>+</sup>) (Boada y col., 2000). Es más, en líneas celulares de tumores se ha descrito la existencia de una proteína (TIGAR), inducible por p53, con actividad fructosa-2,6-bisfosfatásica, cuya expresión promueve aumento del ciclo de las pentosas-fosfato y protección frente a apoptosis (Bensaad y col., 2006). Por último, muy recientemente se ha observado que la liberación de citocromo *c* por la mitocondria durante la apoptosis está constantemente inhibida gracias a que se mantiene en su estado reducido, gracias a la actividad del ciclo de las pentosas-fosfato (Vaughn y Deshmukh 2008). Tomados en su conjunto, los resultados presentados en esta Memoria, y los obtenidos por otros autores en otros linajes celulares y condiciones, nos permiten confirmar que el incremento de la velocidad de la glucólisis en neuronas induce una disminución de la velocidad del ciclo de las pentosas-fosfato capaz de provocar estrés oxidativo, el cual conlleva a la muerte por apoptosis.

Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que las neuronas prefieren emplear glucosa para mantener su estado antioxidante, a expensas de su utilización con fines bioenergéticos, que deberán ser satisfechos por otras fuentes. En este sentido, es bien conocido que el lactato puede ser un sustrato preferencial de las neuronas, incluso en presencia de glucosa (Fernandez y Medina 1986; Vicario y col., 1991; Itoh y col., 2003; Pellerin 2003). En efecto, las neuronas pueden obtener su energía del lactato, el cual les proporciona los astrocitos mediante el mecanismo conocido como lanzadera de lactato (Tsacopoulos y Magistretti 1996; Pellerin y col., 2007). Así, la retirada de glutamato del espacio sináptico, que realizan los astrocitos para hacer posible la neurotransmisión glutamatérgica, está acoplada a la activación de la glucólisis (Pellerin y col., 2007). Esto obliga a los astrocitos a recuperar la razón NAD<sup>+</sup>/NADH(H<sup>+</sup>) mediante la transformación del piruvato en lactato, que se libera al medio extracelular, de donde es captado por las neuronas para reconvertirlo en piruvato y usarlo como fuente de energía en la mitocondria (Pellerin y col., 2007). Nuestros datos apoyan fuertemente esta idea, y

sugieren que, para ello, las neuronas deben mantener inhibida la glucólisis en condiciones normales gracias a constante y activo sistema de degradación proteolítica gobernado por APC/C-Cdh1. Queda por conocer si este complejo sistema está sujeto a regulación bajo condiciones que ahora nos propondremos estudiar.



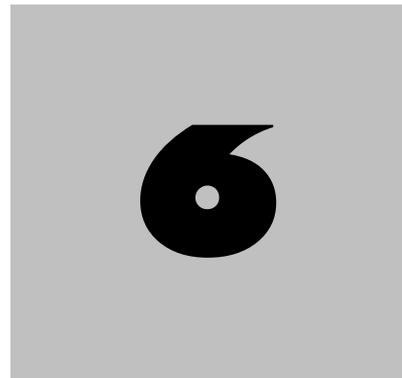
**Figura I.** Relación entre la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato en astrocitos y neuronas en condiciones basales. En astrocitos se produce un equilibrio entre el consumo de glucosa a través de la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato, lo que permite la producción de energía y el mantenimiento de un estado antioxidante. En neuronas, la mayor parte de la glucosa se consume por la vía de las pentosas fosfato para mantener un estado antioxidante, debido a la ausencia de Pfkfb3. Para compensar su baja glucólisis, las neuronas obtienen lactato de los astrocitos, que entrará en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y permitirá mantener el estado bioenergético de las neuronas.

## **7. Implicaciones fisiopatológicas**

Creemos que los resultados aportados en esta Memoria pueden tener, además, interés para la búsqueda de mecanismos implicados en la muerte neuronal asociada a algunas enfermedades neurodegenerativas, así como de posibles dianas terapéuticas. Así, la capacidad de la Pfkfb3 de incrementar el flujo glucolítico en neuronas puede tener impacto en la Enfermedad de Alzheimer, donde se observa una dramática reducción del metabolismo neuronal (Bigl y col., 1999), o en la de Huntington, donde hay un descenso de la actividad glucolítica en las áreas afectadas (Powers y col., 2007). Del estudio futuro de la regulación de la vía Cdh1-Pfkfb3 podrían desprenderse nuevas dianas farmacológicas.

Por otra parte, también creemos nuestros resultados pueden ayudar a comprender mejor la estrecha relación existente entre la Pfkfb3 y los mecanismos tumorales. Así, es conocido que las células cancerosas tienen un elevado metabolismo de la glucosa incluso en presencia de oxígeno, fenómeno conocido como efecto Warburg (Warburg y col., 1924). Además, se ha comprobado que la isoforma Pfkfb3 es la que más contribuye a la gran capacidad glucolítica de las células tumorales (Hamilton y col., 1997; Chesney y col., 1999; Atsumi y col., 2002), y que esto se debe a su elevada actividad cinásica (Okar y col., 2001). Es más, se ha observado que los niveles proteicos de Pfkfb3 incrementan en gran medida en astrocitomas de alto grado con respecto a astrocitomas de bajo grado y a tejidos no neoplásicos (Kessler y col., 2008), y que el silenciamiento de uPFK-2 (RB2K6) reduce la viabilidad de las células cancerosas (Calvo y col., 2006). Por último, en un estudio muy reciente, publicado durante el proceso de edición de esta Memoria, realizado en células HeLa, se muestra que la sobre-expresión de Pfkfb3 incrementa la expresión de Cdk1, lo que provoca un aumento de la proliferación de esta línea tumoral (Yalcin y col., 2009). Por todas estas razones, en los últimos años, Pfkfb3 se ha convertido en posible diana terapéutica para evitar la proliferación de tumores (Clem y col., 2008). Apoyados en nuestros datos, y en los antecedentes bibliográficos, creemos que el hecho de que Pfkfb3 sea degradada proteolíticamente, implicando a Cdh1, puede también ayudar a profundizar en la búsqueda de dianas implicadas en proliferación celular.

## **CONCLUSIONES**





A la vista de los resultados obtenidos en la presente Memoria hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. El RNA mensajero de la isoforma 3 de la 6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (Pfkfb) es, entre las cuatro isoformas de la Pfkfb3, el que se expresa mayoritariamente en neuronas y en astrocitos corticales de rata en cultivo primario. Además, las variantes alternativas RB2K3 y RB2K6 de la Pfkfb3 son los más abundantes en ambos tipos celulares. Sin embargo, mientras que los astrocitos expresan profusamente la proteína Pfkfb3, en las neuronas es indetectable, tanto en cultivos como en animal vivo.

2. En neuronas, la proteína Pfkfb3 está sujeta a una continua degradación por la vía ubiquitina-proteosoma. El complejo APC/C-Cdh1 es la E3 ubiquitina ligasa que controla, mediante el reconocimiento del motivo KEN en posición 142, la estabilidad de la Pfkfb3.

3. Los astrocitos muestran una reducida expresión de Cdh1 y de actividad APC/C-Cdh1 con respecto a las neuronas, lo que da cuenta en los astrocitos de una mayor estabilidad de la Pfkfb3 y velocidad de la vía glucolítica. En neuronas, la velocidad del consumo de glucosa por la vía de las pentosas-fosfato es muy superior al consumo por la vía glucolítica.

4. La estabilización de Pfkfb3 en neuronas, bien por inhibición de Cdh1, bien por sobre-expresión del cDNA de la Pfkfb3, es suficiente para aumentar la velocidad de la glucolisis. Sin embargo, este efecto va asociado a una inhibición concomitante de la velocidad del ciclo de las pentosas-fosfato, lo que conlleva a un estrés oxidativo que conduce a la muerte neuronal por apoptosis.

## **CONCLUSIÓN FINAL**

Las neuronas utilizan glucosa preferentemente por la vía de las pentosas-fosfato con objeto de promover regeneración de glutathione. Este fenómeno está gobernado íntegramente por la E3 ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1, que promueve la ubiquitinación, y degradación proteolítica de la Pfkfb3, lo que conlleva a la inhibición de la glucólisis. Así, las neuronas utilizan la glucosa preferentemente para protegerse del estrés oxidativo, a expensas de su utilización con fines bioenergéticos, que deberán ser satisfechos por otros sustratos.

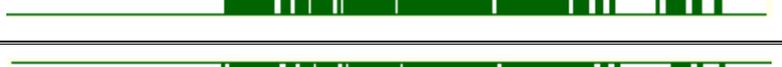
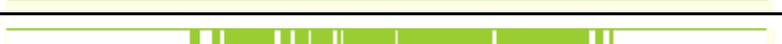
**ANEXOS**





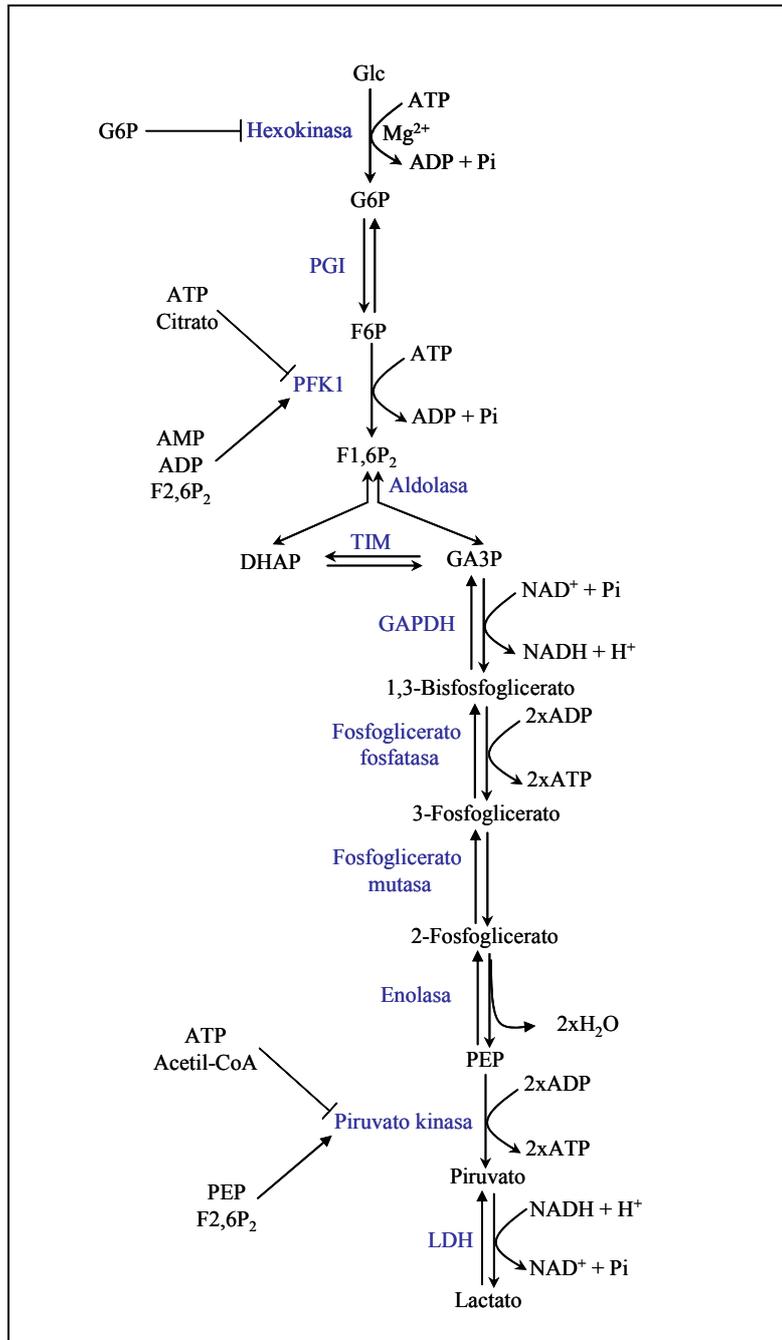
## 1. Alineamiento esquemático de las secuencias de las isoformas de la Pfkfb en distintos organismos

Gen	Especie(s)	Secuencia esquemática
Pfkfb1	Clupeocephala (8 homólogos)	
Pfkfb1	<i>Mus musculus</i>	
Pfkfb1	<i>Rattus norvegicus</i>	
Pfkfb1	<i>Homo sapiens</i>	
Pfkfb1	<i>Gorilla gorilla</i>	
Pfkfb1	<i>Pan troglodytes</i>	
Pfkfb1	Laurasiatheria (9 homólogos)	
Pfkfb1	Eutheria (3 homólogos)	
Pfkfb1	<i>Xenopus tropicalis</i>	
Pfkfb1	<i>Gallus gallus</i>	
Pfkfb4	Clupeocephala (10 homólogos)	
Pfkfb4	Eutheria (5 homólogos)	
Pfkfb4	<i>Pan troglodytes</i>	
Pfkfb4	<i>Homo sapiens</i>	
Pfkfb4	<i>Gorilla gorilla</i>	
Pfkfb4	<i>Rattus norvegicus</i>	
Pfkfb4	<i>Mus musculus</i>	
Pfkfb4	Laurasiatheria (7 homólogos)	
Pfkfb4	<i>Xenopus tropicalis</i>	
Pfkfb4	<i>Gallus gallus</i>	
Pfkfb3	Eutheria (5 homólogos)	
Pfkfb3	<i>Mus musculus</i>	
Pfkfb3	<i>Rattus norvegicus</i>	
Pfkfb3	<i>Pan troglodytes</i>	
Pfkfb3	<i>Homo sapiens</i>	
Pfkfb3	<i>Gorilla gorilla</i>	
Pfkfb3	Laurasiatheria (8 homólogos)	
Pfkfb3	<i>Gallus gallus</i>	
Pfkfb3	<i>Xenopus tropicalis</i>	
Pfkfb3	Clupeocephala (5 homólogos)	

Pfkfb2	Laurasiatheria (8 homólogos)	
Pfkfb2	<i>Pan troglodytes</i>	
Pfkfb2	<i>Homo sapiens</i>	
Pfkfb2	<i>Gorilla gorilla</i>	
Pfkfb2	<i>Mus musculus</i>	
Pfkfb2	<i>Rattus norvegicus</i>	
Pfkfb2	Eutheria (3 homólogos)	
Pfkfb2	Clupeocephala (10 homólogos)	
Pfkfb2	<i>Xenopus tropicalis</i>	
Pfkfb2	<i>Gallus gallus</i>	
Pfkfb	<i>Drosophila melanogaster</i>	
Pfkfb	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

## 2. Glucolisis

Es la vía metabólica encargada de oxidar o fermentar la glucosa y así obtener energía para la célula. Consiste en diez reacciones enzimáticas que convierten la glucosa en piruvato, el cual puede entrar en otras rutas metabólicas y seguir generando energía para la célula. La glucolisis es la forma más rápida de obtener energía para la célula y, además del piruvato, se obtienen 2 moléculas de ATP, 2 de NADH, 2 H<sup>+</sup> y 2 moléculas de agua (Nelson y Cox 2001).



Abreviaturas utilizadas:

DHAP: Dihidroxiacetona fosfato

F6P: Fructosa 6 fosfato

F1,6P2: Fructosa-1,6-bisfosfato

F2,6P2: Fructosa-2,6-bisfosfato

GA3P: Gliceraldehido-3-fosfato

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato  
deshidrogenasa

Glc: Glucosa

G6P: Glucosa 6 fosfato

LDH: Lactato deshidrogenasa

PEP: Fosfoenolpiruvato

PFK1: Fosfofructokinasa 1

PGI: Fosfoglucosa isomerasa

TIM: Triosa fosfato isomerasa

### 3. AMP Kinasa

La AMP kinasa es un sensor del estado energético celular y se activa cuando aumenta la razón AMP:ATP. La AMPK de mamíferos es un complejo heterotrimérico formado por una subunidad catalítica  $\alpha$ , una subunidad reguladora  $\beta$  y otras subunidades  $\gamma$  (Hardie y col., 2003). Cada una de ellas está codificada por dos o tres genes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  y  $\gamma 3$ ). Las subunidades  $\alpha$  contienen un dominio kinasa, un dominio de unión a las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  (Crute y col., 1998) y un dominio autoinhibidor. Las subunidades  $\beta$  tienen un dominio de unión a las otras subunidades y un dominio de unión a glucógeno (Hudson y col., 2003). La subunidad  $\gamma$  contiene dos dominios de unión a AMP denominados dominios Bateman, en los cuales también se puede unir el ATP pero con mucha menor afinidad. La unión de un AMP a un dominio Bateman provoca un cambio conformacional de la AMPK que permite la unión de otro AMP al otro dominio Bateman, lo cual acentúa la sensibilidad de la AMPK por el AMP (Scott y col., 2004).

La AMP kinasa se activa por AMP e inhibida por ATP. La activación por el AMP sucede de tres modos diferentes:

- 1) Activación alostérica (orden de 5 veces) (Pan y col., 2002)
- 2) Fosforilación en la Thr<sup>172</sup> por AMPK kinasa (LKB1) (orden de 50 a 100 veces) (Hawley y col., 1996)
- 3) Inhibición de la desfosforilación de la Thr172 (Davies y col., 1995)

La AMPK regula varias vías metabólicas como la biosíntesis de ácidos grasos, la biosíntesis de colesterol, la oxidación de ácidos grasos, la captación de glucosa o la glucólisis, entre otros efectos.

Se activa por diversos tipos de estrés, tales como estrés celular (isquemia, hipoxia, estrés oxidativo), estrés metabólico durante el ejercicio físico y a la contracción del músculo esquelético (Winder y Hardie 1996), o el tratamiento con de drogas

antidiabéticas, como la metformina, que inhiben el complejo I de la cadena transportadora de electrones (Owen y col., 2000).

#### **4. Sistemas de defensa frente al estrés oxidativo y nitrosativo**

Para hacer frente al estrés oxidativo y nitrosativo, las células disponen de una serie de mecanismos de defensa constituida por sustancias con capacidad antioxidante, como el ascorbato o la vitamina E (Peuchen y col., 1997), así como por enzimas, como la catalasa y la superóxido dismutasa, o sistemas antioxidantes, como el glutathion o la tiorredoxina.

El ascorbato está presente en el sistema nervioso central (SNC) a una concentración mucho mayor que en el resto de los tejidos. Dentro del SNC, se acumula sobre todo en las neuronas (Shimizu y col., 1960) y lleva a cabo su función antioxidante mediante la inactivación directa de especies oxidantes o bien acoplándose al sistema del glutathion. La vitamina E se encuentra a una concentración unas dos veces mayor en astrocitos que en neuronas. Su función antioxidante es, por tanto, importante en células gliales donde se ha descrito que protege la función mitocondrial del daño producido por óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) (Heales y col., 1994).

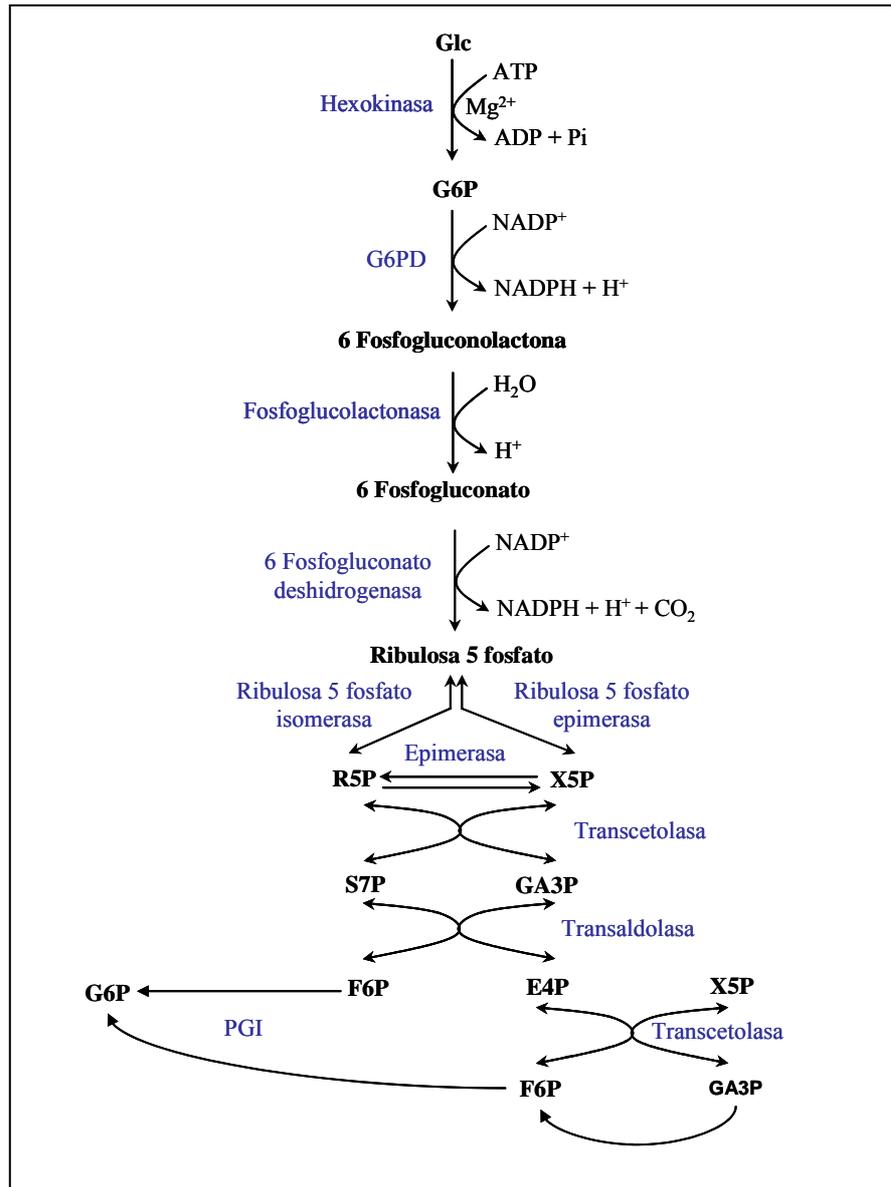
Las enzimas SOD y catalasa permiten la eliminación del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno, respectivamente (Fridovich 1997). La tiorredoxina es una proteína multifuncional que, junto con el NADPH y la tiorredoxina reductasa, forma un sistema capaz de reducir tioles y disulfuros. Este sistema actúa intracelularmente, regulando las interacciones proteína-proteína y proteína-DNA mediante la oxidación o reducción de residuos de Cys. A nivel extracelular protege frente a la apoptosis inducida por estrés oxidativo (Nakamura y col., 1997).

El glutathion es el compuesto tiólico presente en mayor concentración en las células (Meister 1988). Su función más importante es la de antioxidante intracelular, desempeñando un papel crucial en la defensa frente al estrés oxidativo y nitrosativo. El

glutation se sintetiza por la acción consecutiva de la  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa y la glutatión sintetasa, que precisan ATP como cosustrato. La primera de estas enzimas cataliza la reacción limitante de la síntesis de GSH (Dringen 2000). En su acción antioxidante, el glutatión puede combinarse de forma no enzimática con distintos radicales libres, como superóxido, hidroxilo y  $\cdot\text{NO}$ , o actuar como donador de electrones en la reducción de peróxidos en una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. En ambos casos, el producto final es el glutatión oxidado (GSSG) (Dringen 2000). El GSSG así formado es el sustrato de la flavoenzima glutatión reductasa, que transfiere electrones del NADPH al GSSG, regenerando de esta forma el GSH (Kletzien y col., 1994).

## **5. Vía de la pentosas fosfato**

Constituye la vía principal de utilización celular de glucosa alternativa a la glucólisis. Esta vía comprende dos fases, una oxidativa y otra no oxidativa que, en su conjunto, completan un ciclo en el que se metaboliza la G6P y se produce, principalmente, NADPH y R5P. En la fase oxidativa se convierte G6P en R5P, produciéndose dos moles de NADPH por cada mol de G6P que entra en la vía. En la fase no oxidativa se produce la interconversión de pentosas fosfato en hexosas monofosfato mediante una serie de reacciones totalmente reversibles (Baquer y col., 1988; Nelson y Cox 2001).



Abreviaturas utilizadas:

E4P: Eritrosa 4 fosfato

F6P: Fructosa 6 fosfato

GA3P: Gliceraldehido 3 fosfato

Glc: Glucosa

G6P: Glucosa 6 fosfato

G6PD: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

PGI: Fosfogluconasa isomerasa

R5P: Ribosa 5 fosfato

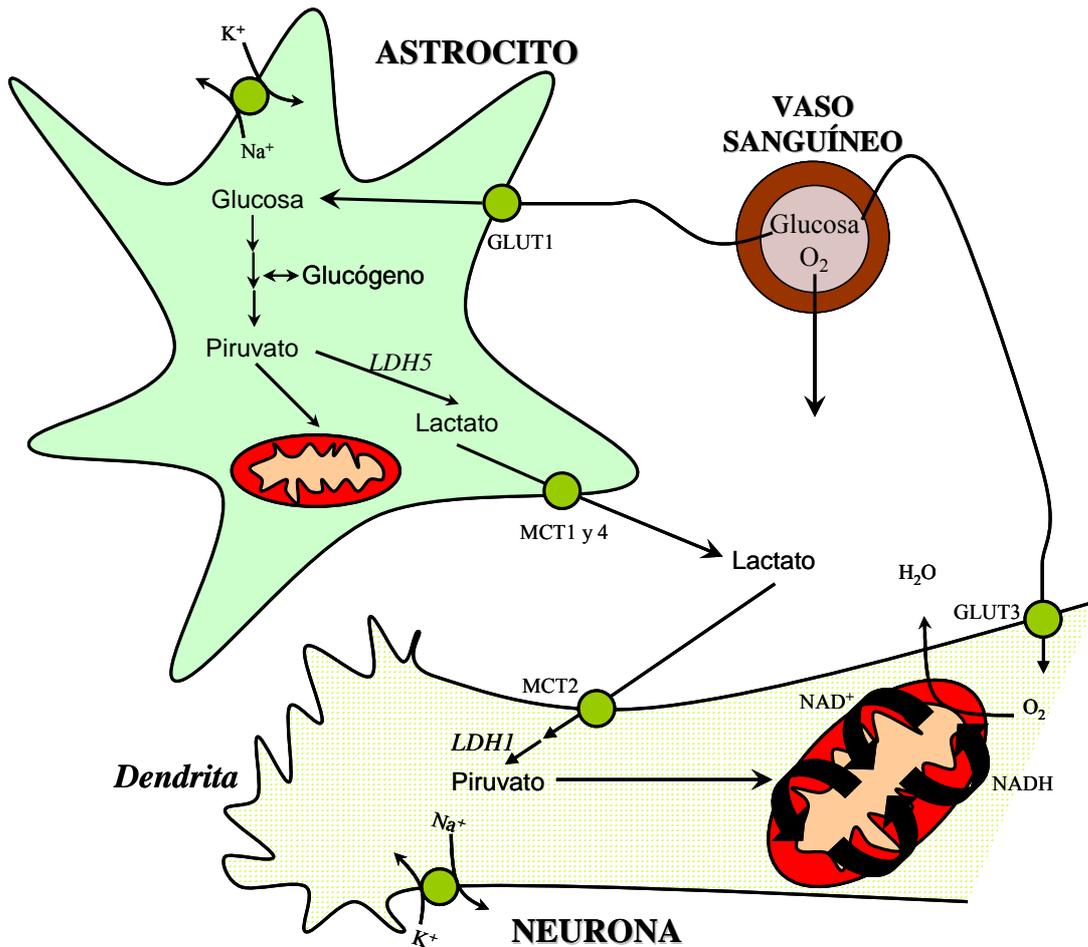
S7P: Sedoheptulosa 7 fosfato

X5P: Xilulosa 5 fosfato

## 6. Lanzadera de lactato

Desde hace años se ha comprobado que los astrocitos juegan un papel fundamental en el mantenimiento del metabolismo neuronal a través de su producción de lactato (Magistretti y Pellerin 1999a). Las diferencias metabólicas entre las neuronas y los astrocitos apoyan esta hipótesis. Recientes análisis del transcriptoma de ambas células han revelado que los astrocitos expresan profusamente las enzimas glucolíticas en comparación con las neuronas (Lovatt y col., 2007). Además, se ha comprobado que estas células tienen una expresión diferente de dos isoformas de la LDH, ya que en los astrocitos la LDH está destinada a la producción de lactato (LDH5), mientras que la LDH de neuronas está destinada al consumo de lactato (LDH1) (Laughton y col., 2007). En astrocitos, el glutamato lleva a la activación de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasa, lo que a su vez estimula la captación de glucosa a través de GLUT1 y la glucólisis.

La glucosa en los astrocitos puede ser almacenada en forma de glucógeno o puede transformarse en piruvato a través de la glucólisis. Este piruvato puede ir al TCA y producir ATP o puede transformarse en lactato y salir del astrocito por los transportadores de monocarboxilato MCT1 y 4. El lactato que se encuentra en el espacio intercelular entra a la neurona a través del transportador de monocarboxilato MCT2 y, ya dentro de la neurona, se transforma en piruvato que entra en el TCA para producir ATP (Laughton y col., 2007). Estos resultados *in vitro* también han sido observados *ex vivo* (Sibson y col., 1998; Schurr y col., 1999). Se ha comprobado que en condiciones de estrés las neuronas incrementan su fosforilación oxidativa y, en el momento en el que se agotan los sustratos de la fosforilación oxidativa, los astrocitos incrementan su actividad glucolítica para abastecer de lactato a las neuronas (Kasischke y col., 2004).

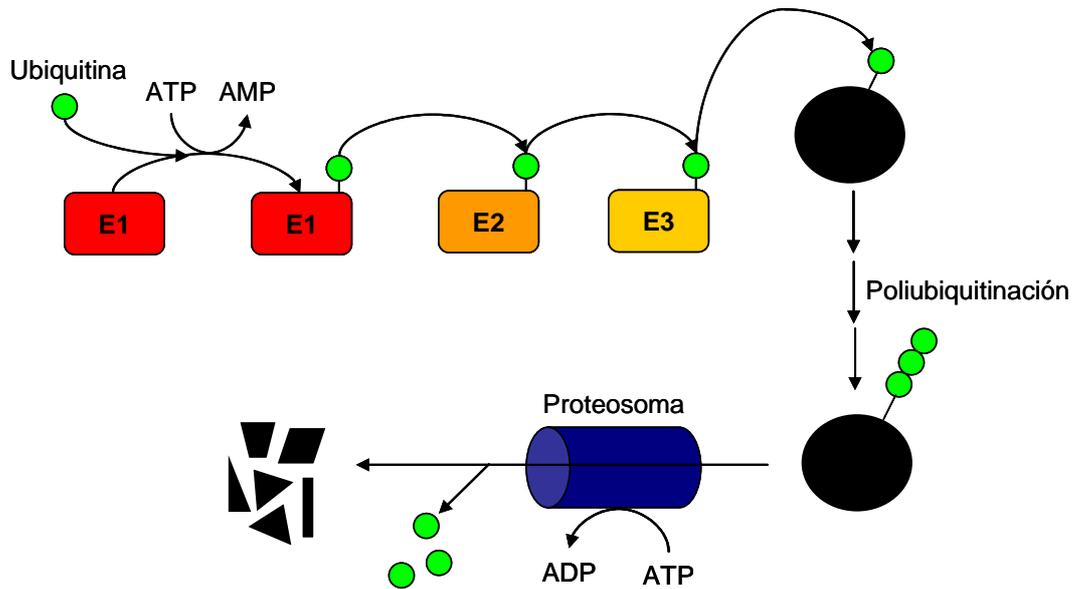


## 7. Vía ubiquitina-proteosoma

Es la vía principal de degradación selectiva de proteínas en células eucariotas. Utiliza a la ubiquitina como marcador de las proteínas citosólicas y nucleares que son diana para una rápida proteólisis. La ubiquitina es un polipéptido de 76 AA que está muy conservado en todos los eucariotas. Las proteínas son marcadas para su degradación mediante la unión de la ubiquitina al grupo amino de la cadena lateral de un residuo de lisina. Además, se pueden unir más ubiquitinas sobre la primera para formar una cadena poliubiquitinada. Estas proteínas poliubiquitinadas son reconocidas y degradadas por un gran complejo proteolítico denominado proteosoma. Las ubiquitinas son liberadas en este proceso, por lo que pueden ser usadas posteriormente. Además,

tanto la unión de la ubiquitina, como la degradación de la proteína diana por el proteosoma requieren energía en forma de ATP (Hershko 1988).

La ubiquitinación es un proceso que requiere varios pasos. En primer lugar la ubiquitina es activada cuando se une a la enzima activadora de ubiquitinas, E1. Después, la ubiquitina es transferida a una segunda enzima llamada enzima conjugante de ubiquitinas o E2. La transferencia final de la ubiquitina a la proteína diana es llevada a cabo por una tercera enzima denominada ubiquitina ligasa o E3, que es la responsable del reconocimiento específico de la proteína diana. En algunos casos la ubiquitina es transferida primero de la enzima E2 a la E3 y después a la proteína diana, pero en otros casos E2 y E3 forman un complejo y juntas transfieren la ubiquitina a la proteína diana. La mayor parte de las células contienen una única enzima E1 y múltiples enzimas E2 y E3. Distintos miembros de la familia de las E2 y E3 reconocen distintas proteínas diana, lo que determina la selectividad de las proteínas diana degradadas por esta ruta (Hershko 1988).



## 8. APC/C Cdh1

La progresión del ciclo celular de las células eucariotas está regulada por la degradación temporal de las proteínas reguladoras del ciclo a través de la vía del ubiquitin-proteosoma. Hay dos complejos proteicos que dirigen la progresión del ciclo celular de las células eucariotas: APC/C (Anaphase-promoting complex/cyclosome) y la proteína Skp1/Cullin/F-box (SCF) (Baker y col., 2007)

APC/C es una E3 ubiquitina ligasa que provoca la degradación de muchos sustratos durante la mitosis. APC/C tiene dos subunidades activadoras que son Cdc20 y Cdh1, que confieren a la misma especificidad por su proteína diana. La regulación de Cdc20 y Cdh1 es crítica para a correcta actividad de APC/C y ocurre de diferentes maneras: degradación de proteínas marcadas, fosforilación y unión a proteínas inhibitoras. Cdc20 activa a APC/C durante la transición entre la metafase y la anafase, mientras que Cdh1 lo hace durante la anafase y la mitosis temprana (Peters y col., 1996).

APC/C es un complejo multiproteico formado por al menos 11 unidades. La subunidad mayor es Apc1, que se expresa a niveles constantes durante el ciclo celular y se fosforila específicamente durante la mitosis (Peters y col., 1996). Otras dos subunidades importantes son Apc3/Cdc27 y Apc7, que se unen con Cdc20 y Cdh1 a través de un dipéptido de isoleucina y arginina que se encuentra en la región carboxilo de Cdc20 y Cdh1 (Passmore y col., 2003). Cuando Cdh1 se une a APC/C, se produce un cambio conformacional en la última que lleva a su activación (Dube y col., 2005).

Los coactivadores Cdc20 y Cdh1 sólo se unen transitoriamente a APC/C. Las proteínas diana que van a ser reconocidas y ubiquitinadas por APC/C deben de tener una caja de destrucción (D-Box) o una caja KEN (Pfleger y Kirschner 2000). La caja D-Box presenta una secuencia consenso RXXLXXXN, mientras que la secuencia consenso de la caja KEN es KEN como su propio nombre indica, y es reconocida preferiblemente por el complejo APC/C Cdh1.



## **BIBLIOGRAFÍA**



**8**



**Akerman K. E. y Jarvisalo J. O.** (1980) Effects of ionophores and metabolic inhibitors on the mitochondrial membrane potential within isolated hepatocytes as measured with the safranin method. *The Biochemical journal* **192**, 183-190.

**Almeida A., Moncada S. y Bolanos J. P.** (2004) Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nature cell biology* **6**, 45-51.

**Almeida A., Bolanos J. P. y Moreno S.** (2005) Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci* **25**, 8115-8121.

**Almeida A., Heales S. J., Bolanos J. P. y Medina J. M.** (1998) Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res* **790**, 209-216.

**Almeida A., Almeida J., Bolanos J. P. y Moncada S.** (2001) Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 15294-15299.

**Andriezen W. L.** (1893) On a system of fibre-like cells surrounding the blood vessels of the brain of man and mammals, and its physiological significance. *Int Monatsschr Anat Physiol* **10**, 532-540.

**Aragon J. J., Gomez M. E. y Gancedo C.** (1987) Identification of two forms of 6-phosphofructo-2-kinase in yeast. *FEBS letters* **226**, 121-124.

**Araque A.** (2008) Astrocytes process synaptic information. *Neuron glia biology* **4**, 3-10.

**Assimakopoulos-Jeannot F. y Jeanrenaud B.** (1990) Insulin activates 6-phosphofructo-2-kinase and pyruvate kinase in the liver. Indirect evidence for an action via a phosphatase. *The Journal of biological chemistry* **265**, 7202-7206.

**Atsumi T., Chesney J., Metz C., Leng L., Donnelly S., Makita Z., Mitchell R. y Bucala R.** (2002) High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer research* **62**, 5881-5887.

**Baker D. J., Dawlaty M. M., Galardy P. y van Deursen J. M.** (2007) Mitotic regulation of the anaphase-promoting complex. *Cell Mol Life Sci* **64**, 589-600.

**Baltrusch S., Lenzen S., Okar D. A., Lange A. J. y Tiedge M.** (2001) Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner. *The Journal of biological chemistry* **276**, 43915-43923.

**Bando H., Atsumi T., Nishio T., Niwa H., Mishima S., Shimizu C., Yoshioka N., Bucala R. y Koike T.** (2005) Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 5784-5792.

**Baquer N. Z., Hothersall J. S. y McLean P.** (1988) Function and regulation of the pentose phosphate pathway in brain. *Current topics in cellular regulation* **29**, 265-289.

**Bazan J. F., Fletterick R. J. y Pilkis S. J.** (1989) Evolution of a bifunctional enzyme: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 9642-9646.

**Bedri A., Kretschmer M., Schellenberger W. y Hofmann E.** (1989) Kinetics of 6-phosphofructo-2-kinase from *Saccharomyces cerevisiae*: inhibition of the enzyme by ATP. *Biomedica biochimica acta* **48**, 403-411.

**Bell J. E., Hume R., Busuttil A. y Burchell A.** (1993) Immunocytochemical detection of the microsomal glucose-6-phosphatase in human brain astrocytes. *Neuropathology and applied neurobiology* **19**, 429-435.

**Ben-Yoseph O., Boxer P. A. y Ross B. D.** (1996) Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. *Journal of neurochemistry* **66**, 2329-2337.

**Bensaad K., Tsuruta A., Selak M. A., Vidal M. N., Nakano K., Bartrons R., Gottlieb E. y Vousden K. H.** (2006) TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* **126**, 107-120.

**Bergmeyer H. U., Bernt E., Schmidt F. y Stork H.** (1974) Determination with hexokinase and glucoses-phosphate dehydrogenase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer, H. U.), pp 1196-1201. Verlag Chemie GmbH, Weinheim.

**Bertrand L., Deprez J., Vertommen D., Di Pietro A., Hue L. y Rider M. H.** (1997) Site-directed mutagenesis of Lys-174, Asp-179 and Asp-191 in the 2-kinase domain of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *The Biochemical journal* **321** (Pt 3), 623-627.

**Bertrand L., Alessi D. R., Deprez J., Deak M., Viaene E., Rider M. H. y Hue L.** (1999) Heart 6-phosphofructo-2-kinase activation by insulin results from Ser-466 and Ser-483 phosphorylation and requires 3-phosphoinositide-dependent kinase-1, but not protein kinase B. *The Journal of biological chemistry* **274**, 30927-30933.

**Bigl M., Bruckner M. K., Arendt T., Bigl V. y Eschrich K.** (1999) Activities of key glycolytic enzymes in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **106**, 499-511.

**Bigl M., Bleyl A. D., Zedlick D., Arendt T., Bigl V. y Eschrich K.** (1996) Changes of activity and isozyme pattern of phosphofructokinase in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* **67**, 1164-1171.

**Blumcke I., Eggl P. y Celio M. R.** (1995) Relationship between astrocytic processes and "perineuronal nets" in rat neocortex. *Glia* **15**, 131-140.

**Boada J., Roig T., Perez X., Gamez A., Bartrons R., Cascante M. y Bermudez J.** (2000) Cells overexpressing fructose-2,6-bisphosphatase showed enhanced pentose phosphate pathway flux and resistance to oxidative stress. *FEBS letters* **480**, 261-264.

**Bolanos J. P., Peuchen S., Heales S. J., Land J. M. y Clark J. B.** (1994) Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *Journal of neurochemistry* **63**, 910-916.

**Bouzier-Sore A. K., Voisin P., Canioni P., Magistretti P. J. y Pellerin L.** (2003) Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 1298-1306.

**Bowen D. M., White P., Spillane J. A., Goodhardt M. J., Curzon G., Iwangoff P., Meier-Ruge W. y Davison A. N.** (1979) Accelerated ageing or selective neuronal loss as an important cause of dementia? *Lancet* **1**, 11-14.

**Brorson J. R., Schumacker P. T. y Zhang H.** (1999) Nitric oxide acutely inhibits neuronal energy production. The Committees on Neurobiology and Cell Physiology. *J Neurosci* **19**, 147-158.

**Brummelkamp T. R., Bernards R. y Agami R.** (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science (New York, N.Y)* **296**, 550-553.

**Buchet K. y Godinot C.** (1998) Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. *The Journal of biological chemistry* **273**, 22983-22989.

**Calvo M. N., Bartrons R., Castano E., Perales J. C., Navarro-Sabate A. y Manzano A.** (2006) PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS letters* **580**, 3308-3314.

**Cataldo A. M. y Broadwell R. D.** (1986) Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *Journal of neurocytology* **15**, 511-524.

**Cavanagh J. B.** (1999) Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res Brain Res Rev* **29**, 265-295.

**Cidad P., Almeida A. y Bolanos J. P.** (2004) Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide rapidly stimulates cytoprotective GLUT3-mediated glucose uptake through 5'-AMP-activated protein kinase. *The Biochemical journal* **384**, 629-636.

**Clarke D. D. y Sokoloff L.** (1994) Circulation and energy metabolism of the brain (Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W. and Molinoff P.B., eds), in *Basic Neurochemistry* (Press R., ed.), pp 645-680, New York.

**Claus T. H., Schlumpf J. R., El-Maghrabi M. R. y Pilkis S. J.** (1982) Regulation of the phosphorylation and activity of 6-phosphofructo 1-kinase in isolated hepatocytes by alpha-glycerolphosphate and fructose 2,6-bisphosphate. *The Journal of biological chemistry* **257**, 7541-7548.

**Claus T. H., El-Maghrabi M. R., Regen D. M., Stewart H. B., McGrane M., Kountz P. D., Nyfeler F., Pilkis J. y Pilkis S. J.** (1984) The role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism. *Current topics in cellular regulation* **23**, 57-86.

**Clem B., Telang S., Clem A., Yalcin A., Meier J., Simmons A., Rasku M. A., Arumugam S., Dean W. L., Eaton J., Lane A., Trent J. O. y Chesney J.** (2008) Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Molecular cancer therapeutics* **7**, 110-120.

**Crute B. E., Seefeld K., Gamble J., Kemp B. E. y Witters L. A.** (1998) Functional domains of the alpha catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **273**, 35347-35354.

**Cuende J., Moreno S., Bolanos J. P. y Almeida A.** (2008) Retinoic acid downregulates Rael leading to APC(Cdh1) activation and neuroblastoma SH-SY5Y differentiation. *Oncogene* **27**, 3339-3344.

**Chesney J.** (2006) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **9**, 535-539.

**Chesney J., Mitchell R., Benigni F., Bacher M., Spiegel L., Al-Abed Y., Han J. H., Metz C. y Bucala R.** (1999) An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 3047-3052.

**Davies S. P., Helps N. R., Cohen P. T. y Hardie D. G.** (1995) 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS letters* **377**, 421-425.

**Delgado-Esteban M., Almeida A. y Bolanos J. P.** (2000) D-Glucose prevents glutathione oxidation and mitochondrial damage after glutamate receptor stimulation in rat cortical primary neurons. *Journal of neurochemistry* **75**, 1618-1624.

**Denis-Pouxviel C., Gauthier T., Daviaud D. y Murat J. C.** (1990) Phosphofructokinase 2 and glycolysis in HT29 human colon adenocarcinoma cell line. Regulation by insulin and phorbol esters. *The Biochemical journal* **268**, 465-470.

**Deprez J., Vertommen D., Alessi D. R., Hue L. y Rider M. H.** (1997) Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *The Journal of biological chemistry* **272**, 17269-17275.

**Di Chiro G., DeLaPaz R. L., Brooks R. A., Sokoloff L., Kornblith P. L., Smith B. H., Patronas N. J., Kufta C. V., Kessler R. M., Johnston G. S., Manning R. G. y Wolf A. P.** (1982) Glucose utilization of cerebral gliomas measured by [18F] fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *Neurology* **32**, 1323-1329.

**Diaz-Hernandez J. I., Moncada S., Bolanos J. P. y Almeida A.** (2007) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects neurons against apoptosis induced by oxidative stress. *Cell death and differentiation* **14**, 1211-1221.

**Dringen R.** (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology* **62**, 649-671.

**Dringen R. y Hamprecht B.** (1992) Glucose, insulin, and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures. *Journal of neurochemistry* **58**, 511-517.

**Dringen R., Gebhardt R. y Hamprecht B.** (1993) Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res* **623**, 208-214.

**Dube P., Herzog F., Gieffers C., Sander B., Riedel D., Muller S. A., Engel A., Peters J. M. y Stark H.** (2005) Localization of the coactivator Cdh1 and the cullin subunit Apc2 in a cryo-electron microscopy model of vertebrate APC/C. *Molecular cell* **20**, 867-879.

**Duran J., Gomez M., Navarro-Sabate A., Riera-Sans L., Obach M., Manzano A., Perales J. C. y Bartrons R.** (2008) Characterization of a new liver- and kidney-specific pfkfb3 isozyme that is downregulated by cell proliferation and dedifferentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **367**, 748-754.

**Edmond J.** (1992) Energy metabolism in developing brain cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **70 Suppl**, S118-129.

**El-Maghrabi M. R., Claus T. H., Pilkis J. y Pilkis S. J.** (1981) Partial purification of a rat liver enzyme that catalyzes the formation of fructose 2,6-bisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* **101**, 1071-1077.

**El-Maghrabi M. R., Pate T. M., Murray K. J. y Pilkis S. J.** (1984) Differential effects of proteolysis and protein modification on the activities of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *The Journal of biological chemistry* **259**, 13096-13103.

**Fernandez E. y Medina J. M.** (1986) Lactate utilization by the neonatal rat brain in vitro. Competition with glucose and 3-hydroxybutyrate. *The Biochemical journal* **234**, 489-492.

**Fridovich I.** (1997) Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of biological chemistry* **272**, 18515-18517.

**Furuya E. y Uyeda K.** (1981) A novel enzyme catalyzes the synthesis of activation factor from ATP and D-fructose-6-P. *The Journal of biological chemistry* **256**, 7109-7112.

**Furuya E., Yokoyama M. y Uyeda K.** (1982) An enzyme that catalyzes hydrolysis of fructose-2, 6-bisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* **105**, 264-270.

**Garcia-Nogales P., Almeida A. y Bolanos J. P.** (2003) Peroxynitrite protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. A key role for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neuroprotection. *The Journal of biological chemistry* **278**, 864-874.

**Garcia-Nogales P., Almeida A., Fernandez E., Medina J. M. y Bolanos J. P.** (1999) Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide-mediated glutathione depletion in cultured rat astrocytes. *Journal of neurochemistry* **72**, 1750-1758.

**Grosche J., Matyash V., Moller T., Verkhratsky A., Reichenbach A. y Kettenmann H.** (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nature neuroscience* **2**, 139-143.

**Guixe V. y Babul J.** (1985) Effect of ATP on phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme altered in the allosteric site for MgATP. *The Journal of biological chemistry* **260**, 11001-11005.

**Gutmann I. y Wahlefeld A. W.** (1974), in *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer, H. U.) (GmbH V. C., ed.), pp 1464-1468, Weinheim.

**Hamilton J. A., Callaghan M. J., Sutherland R. L. y Watts C. K.** (1997) Identification of PRG1, a novel progestin-responsive gene with sequence homology to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md **11**, 490-502.

**Hammerstedt R. H.** (1973) The use of Dowex-1-borate to separate 3HOH from 2-3H-glucose. *Analytical biochemistry* **56**, 292-293.

**Harada Y., Tominaga N., Watanabe M., Shimokawa R., Ishiguro M. y Sakakibara R.** (1997) Inhibition of fructose-6-phosphate,2-kinase by N-bromoacetyethanolamine phosphate in vitro and in vivo. *Journal of biochemistry* **121**, 724-730.

**Hardie D. G., Scott J. W., Pan D. A. y Hudson E. R.** (2003) Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS letters* **546**, 113-120.

**Hasemann C. A., Istvan E. S., Uyeda K. y Deisenhofer J.** (1996) The crystal structure of the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase reveals distinct domain homologies. *Structure* **4**, 1017-1029.

**Hawley S. A., Davison M., Woods A., Davies S. P., Beri R. K., Carling D. y Hardie D. G.** (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **271**, 27879-27887.

**Haydon P. G.** (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* **2**, 185-193.

**Heales S. J., Bolanos J. P., Land J. M. y Clark J. B.** (1994) Trolox protects mitochondrial complex IV from nitric oxide-mediated damage in astrocytes. *Brain Res* **668**, 243-245.

**Hers H. G. y Van Schaftingen E.** (1982) Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *The Biochemical journal* **206**, 1-12.

**Hershko A.** (1988) Ubiquitin-mediated protein degradation. *The Journal of biological chemistry* **263**, 15237-15240.

**Hertz L. y Peng L.** (1992) Energy metabolism at the cellular level of the CNS. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **70 Suppl**, S145-157.

**Hertz L., Yu A. C. y Schousboe A.** (1992) Uptake and metabolism of malate in neurons and astrocytes in primary cultures. *Journal of neuroscience research* **33**, 289-296.

**Hothersall J. S., Baquer N., Greenbaum A. L. y McLean P.** (1979) Alternative pathways of glucose utilization in brain. Changes in the pattern of glucose utilization in brain during development and the effect of phenazine methosulfate on the integration of metabolic routes. *Archives of biochemistry and biophysics* **198**, 478-492.

**Howe F. A., Barton S. J., Cudlip S. A., Stubbs M., Saunders D. E., Murphy M., Wilkins P., Opstad K. S., Doyle V. L., McLean M. A., Bell B. A. y Griffiths J. R.** (2003) Metabolic profiles of human brain tumors using quantitative in vivo <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* **49**, 223-232.

**Huang M. y Veech R. L.** (1982) The quantitative determination of the in vivo dephosphorylation of glucose 6-phosphate in rat brain. *The Journal of biological chemistry* **257**, 11358-11363.

**Hudson E. R., Pan D. A., James J., Lucocq J. M., Hawley S. A., Green K. A., Baba O., Terashima T. y Hardie D. G.** (2003) A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol* **13**, 861-866.

**Hughes S. D., Quaade C., Johnson J. H., Ferber S. y Newgard C. B.** (1993) Transfection of AtT-20ins cells with GLUT-2 but not GLUT-1 confers glucose-stimulated insulin secretion. Relationship to glucose metabolism. *The Journal of biological chemistry* **268**, 15205-15212.

**Itoh Y., Esaki T., Shimoji K., Cook M., Law M. J., Kaufman E. y Sokoloff L.** (2003) Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4879-4884.

**Iwangoff P., Armbruster R., Enz A. y Meier-Ruge W.** (1980) Glycolytic enzymes from human autoptic brain cortex: normal aged and demented cases. *Mechanisms of ageing and development* **14**, 203-209.

**Kabashima T., Kawaguchi T., Wadzinski B. E. y Uyeda K.** (2003) Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5107-5112.

**Kacem K., Lacombe P., Seylaz J. y Bonvento G.** (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* **23**, 1-10.

**Kasischke K. A., Vishwasrao H. D., Fisher P. J., Zipfel W. R. y Webb W. W.** (2004) Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science (New York, N.Y)* **305**, 99-103.

**Katz J., Rogstad R. y Kemp R. G.** (1965) Isotope Discrimination Effects in the Metabolism of Tritiated Glucose. *The Journal of biological chemistry* **240**, PC1484-1486.

**Kessler R. y Eschrich K.** (2001) Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. *Brain research* **87**, 190-195.

**Kessler R., Bleichert F., Warnke J. P. y Eschrich K.** (2008) 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) is up-regulated in high-grade astrocytomas. *Journal of neuro-oncology* **86**, 257-264.

**Kessler T., Fehrmann F., Bieker R., Berdel W. E. y Mesters R. M.** (2007) Vascular endothelial growth factor and its receptor as drug targets in hematological malignancies. *Current drug targets* **8**, 257-268.

**Kimata Y., Trickey M., Izawa D., Gannon J., Yamamoto M. y Yamano H.** (2008) A mutual inhibition between APC/C and its substrate Mes1 required for meiotic progression in fission yeast. *Developmental cell* **14**, 446-454.

**Kitajima S., Sakakibara R. y Uyeda K.** (1984) Kinetic studies of fructose 6-phosphate,2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase. *The Journal of biological chemistry* **259**, 6896-6903.

**Kitamura K., Kangawa K., Matsuo H. y Uyeda K.** (1988) Phosphorylation of myocardial fructose-6-phosphate,2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. Activation by phosphorylation and amino acid sequences of the phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry* **263**, 16796-16801.

**Kletzien R. F., Harris P. K. y Foellmi L. A.** (1994) Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *Faseb J* **8**, 174-181.

- Kountz P. D., el-Maghrabi M. R. y Pilkis S. J.** (1985) Isolation and characterization of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from bovine liver. *Archives of biochemistry and biophysics* **238**, 531-543.
- Kretschmer M. y Hofmann E.** (1984) Inhibition of rat liver phosphofructokinase-2 by phosphoenolpyruvate and ADP. *Biochem Biophys Res Commun* **124**, 793-796.
- Kumar S. y Lavin M. F.** (1996) The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell death and differentiation* **3**, 255-267.
- Kusmaul L., Hamprecht B. y Dringen R.** (1999) The detoxification of cumene hydroperoxide by the glutathione system of cultured astroglial cells hinges on hexose availability for the regeneration of NADPH. *Journal of neurochemistry* **73**, 1246-1253.
- Lafora G. R. y Glueck B.** (1911) Beitrag zur Histopathologie der myoklonischen Epilepsie. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* **6**, 1-14.
- Laloux M., Van Schaftingen E., Francois J. y Hers H. G.** (1985) Phosphate dependency of phosphofructokinase 2. *Eur J Biochem* **148**, 155-159.
- Larrabee M. G.** (1990) Evaluation of the pentose phosphate pathway from  $^{14}\text{CO}_2$  data. Fallibility of a classic equation when applied to non-homogeneous tissues. *The Biochemical journal* **272**, 127-132.
- Laughton J. D., Bittar P., Charnay Y., Pellerin L., Kovari E., Magistretti P. J. y Bouras C.** (2007) Metabolic compartmentalization in the human cortex and hippocampus: evidence for a cell- and region-specific localization of lactate dehydrogenase 5 and pyruvate dehydrogenase. *BMC neuroscience* **8**, 35.
- Li L., Lin K., Correia J. J. y Pilkis S. J.** (1992) Lysine 356 is a critical residue for binding the C-6 phospho group of fructose 2,6-bisphosphate to the fructose-2,6-bisphosphatase domain of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *The Journal of biological chemistry* **267**, 16669-16675.
- Lin K., Li L., Correia J. J. y Pilkis S. J.** (1992) Arg-257 and Arg-307 of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase bind the C-2 phospho group of fructose-2,6-bisphosphate in the fructose-2,6-bisphosphatase domain. *The Journal of biological chemistry* **267**, 19163-19171.
- Lovatt D., Sonnewald U., Waagepetersen H. S., Schousboe A., He W., Lin J. H., Han X., Takano T., Wang S., Sim F. J., Goldman S. A. y Nedergaard M.** (2007) The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J Neurosci* **27**, 12255-12266.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**, 265-275.

**Maestre C., Delgado-Esteban M., Gomez-Sanchez J. C., Bolanos J. P. y Almeida A.** (2008) Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity. *The EMBO journal* **27**, 2736-2745.

**Magistretti P. J. y Pellerin L.** (1999a) Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News Physiol Sci* **14**, 177-182.

**Magistretti P. J. y Pellerin L.** (1999b) Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **354**, 1155-1163.

**Magistretti P. J., Hof P. R. y Martin J. L.** (1986) Adenosine stimulates glycogenolysis in mouse cerebral cortex: a possible coupling mechanism between neuronal activity and energy metabolism. *J Neurosci* **6**, 2558-2562.

**Manes N. P. y El-Maghrabi M. R.** (2005) The kinase activity of human brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase is regulated via inhibition by phosphoenolpyruvate. *Archives of biochemistry and biophysics* **438**, 125-136.

**Marsin A. S., Bouzin C., Bertrand L. y Hue L.** (2002) The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *The Journal of biological chemistry* **277**, 30778-30783.

**Marsin A. S., Bertrand L., Rider M. H., Deprez J., Beauloye C., Vincent M. F., Van den Berghe G., Carling D. y Hue L.** (2000) Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol* **10**, 1247-1255.

**Martin S. J. y Green D. R.** (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* **82**, 349-352.

**Mathews C. K., Van Holde K. E. y Ahern K. G.** (2002) *Bioquímica*. Pearson Education, S.A., Madrid.

**McIlwain H.** (1953) Substances which support respiration and metabolic response to electrical impulses in human cerebral tissues. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **16**, 257-266.

**Medina J. M., Fernández E., Bolaños J. P., Vicario C. y Arizmendi C.** (1990) Fuel supply to the brain during the early postnatal period, in *Endocrine and Biochemical Development of the Fetus and Neonatus* (Cuezva J.M., Pascuel-Leone A.M. and Patel M.S, eds), pp 311-382. Plenum Press, New York.

**Meister A.** (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *The Journal of biological chemistry* **263**, 17205-17208.

**Michal G.** (1985a), in *Methods of Enzymatic Analysis* (eds. Bergmeyer, J. & Graßl, M.) (Chemie V., ed.), pp 191-198, Weinheim, Deerfield Beach (FL), Basel.

**Michal G.** (1985b), in *Methods of Enzymatic Analysis* (eds. Bergmeyer, J. & Graßl, M.) (Chemie V., ed.), pp 342-350, Weinheim, Deerfield Beach (FL), Basel.

**Michels P. A. y Rigden D. J.** (2006) Evolutionary analysis of fructose 2,6-bisphosphate metabolism. *IUBMB life* **58**, 133-141.

**Minchenko A., Leshchinsky I., Opentanova I., Sang N., Srinivas V., Armstead V. y Caro J.** (2002) Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *The Journal of biological chemistry* **277**, 6183-6187.

**Minchenko O., Opentanova I., Minchenko D., Ogura T. y Esumi H.** (2004) Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  activation. *FEBS letters* **576**, 14-20.

**Morgello S., Uson R. R., Schwartz E. J. y Haber R. S.** (1995) The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. *Glia* **14**, 43-54.

**Mykhalchenko V. G., Minchenko D. O., Tsuchihara K., Moenner M., Komisarenko S. V., Bikfalvi A., Esumi H. y Minchenko O. H.** (2008) Expression of mouse 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 mRNA alternative splice variants in hypoxia. *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal* **80**, 19-25.

**Nakamura H., Nakamura K. y Yodoi J.** (1997) Redox regulation of cellular activation. *Annual review of immunology* **15**, 351-369.

**Navarro-Sabate A., Manzano A., Riera L., Rosa J. L., Ventura F. y Bartrons R.** (2001) The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): promoter characterization and genomic structure. *Gene* **264**, 131-138.

**Nelson D. L. y Cox M. M.** (2001) *Lehninger, principles of biochemistry third edition.*

**Nishimura M. y Uyeda K.** (1995) Purification and characterization of a novel xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase catalyzing dephosphorylation of fructose-6-phosphate, 2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase. *The Journal of biological chemistry* **270**, 26341-26346.

**Nishimura M., Fedorov S. y Uyeda K.** (1994) Glucose-stimulated synthesis of fructose 2,6-bisphosphate in rat liver. Dephosphorylation of fructose 6-phosphate, 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase and activation by a sugar phosphate. *The Journal of biological chemistry* **269**, 26100-26106.

**Obach M., Navarro-Sabate A., Caro J., Kong X., Duran J., Gomez M., Perales J. C., Ventura F., Rosa J. L. y Bartrons R.** (2004) 6-Phosphofructo-2-kinase (pfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *The Journal of biological chemistry* **279**, 53562-53570.

**Ohtsuka T., Ryu H., Minamishima Y. A., Macip S., Sagara J., Nakayama K. I., Aaronson S. A. y Lee S. W.** (2004) ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nature cell biology* **6**, 121-128.

**Okar D. A., Wu C. y Lange A. J.** (2004) Regulation of the regulatory enzyme, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Advances in enzyme regulation* **44**, 123-154.

**Okar D. A., Lange A. J. y Wu C.** (2009) Interaction with PFK-/FBP-2 is essential to glucokinase molecular physiology. *Cell Mol Life Sci* **66**, 731-732.

**Okar D. A., Kakalis L. T., Narula S. S., Armitage I. M. y Pilkis S. J.** (1995) Identification of transient intermediates in the bisphosphatase reaction of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase by <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy. *The Biochemical journal* **308 ( Pt 1)**, 189-195.

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

**Owen M. R., Doran E. y Halestrap A. P.** (2000) Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical journal* **348 Pt 3**, 607-614.

**Pan Y., Zhai P., Dashti A. M., Wu S., Lin X. y Wu M.** (2002) A combined gene delivery by co-transduction of adenoviral and retroviral vectors for cancer gene therapy. *Cancer letters* **184**, 179-188.

**Parri H. R., Gould T. M. y Crunelli V.** (2001) Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nature neuroscience* **4**, 803-812.

**Passmore L. A., McCormack E. A., Au S. W., Paul A., Willison K. R., Harper J. W. y Barford D.** (2003) Doc1 mediates the activity of the anaphase-promoting complex by contributing to substrate recognition. *The EMBO journal* **22**, 786-796.

**Pauwels P. J., Opperdoes F. R. y Trouet A.** (1985) Effects of antimycin, glucose deprivation, and serum on cultures of neurons, astrocytes, and neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry* **44**, 143-148.

**Payne V. A., Arden C., Wu C., Lange A. J. y Agius L.** (2005) Dual role of phosphofructokinase-2/fructose bisphosphatase-2 in regulating the compartmentation and expression of glucokinase in hepatocytes. *Diabetes* **54**, 1949-1957.

**Pellerin L.** (2003) Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochemistry international* **43**, 331-338.

**Pellerin L. y Magistretti P. J.** (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10625-10629.

**Pellerin L., Bouzier-Sore A. K., Aubert A., Serres S., Merle M., Costalat R. y Magistretti P. J.** (2007) Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* **55**, 1251-1262.

**Perea G. y Araque A.** (2006) Synaptic information processing by astrocytes. *Journal of physiology, Paris* **99**, 92-97.

**Peters J. M., King R. W., Hoog C. y Kirschner M. W.** (1996) Identification of BIME as a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science (New York, N.Y)* **274**, 1199-1201.

**Peuchen S., Bolanos J. P., Heales S. J., Almeida A., Duchen M. R. y Clark J. B.** (1997) Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Progress in neurobiology* **52**, 261-281.

**Pfleger C. M. y Kirschner M. W.** (2000) The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes & development* **14**, 655-665.

**Pilkis S. J., El-Maghrabi M. R., Pilkis J. y Claus T.** (1981a) Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *The Journal of biological chemistry* **256**, 3619-3622.

**Pilkis S. J., Pilkis J., el-Maghrabi M. R. y Claus T. H.** (1985) The sugar phosphate specificity of rat hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *The Journal of biological chemistry* **260**, 7551-7556.

**Pilkis S. J., El-Maghrabi M. R., Pilkis J., Claus T. H. y Cumming D. A.** (1981b) Fructose 2,6-bisphosphate. A new activator of phosphofructokinase. *The Journal of biological chemistry* **256**, 3171-3174.

**Pilkis S. J., Regen D. M., Stewart H. B., Pilkis J., Pate T. M. y El-Maghrabi M. R.** (1984) Evidence for two catalytic sites on 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. Dynamics of substrate exchange and phosphoryl enzyme formation. *The Journal of biological chemistry* **259**, 949-958.

**Pilkis S. J., Chrisman T., Burgress B., McGrane M., Colosia A., Pilkis J., Claus T. H. y el-Maghrabi M. R.** (1983) Rat hepatic 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: a unique bifunctional enzyme. *Advances in enzyme regulation* **21**, 147-173.

**Powers W. J., Videen T. O., Markham J., McGee-Minnich L., Antenor-Dorsey J. V., Hershey T. y Perlmutter J. S.** (2007) Selective defect of in vivo glycolysis in early Huntington's disease striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 2945-2949.

**Pozuelo Rubio M., Peggie M., Wong B. H., Morrice N. y MacKintosh C.** (2003) 14-3-3s regulate fructose-2,6-bisphosphate levels by binding to PKB-phosphorylated cardiac fructose-2,6-bisphosphate kinase/phosphatase. *The EMBO journal* **22**, 3514-3523.

**Ramón y Cajal S.** (1899) Comparative study of the sensory areas of the human cortex. W.E. Story and L.N. Wilson, dirs., Clark University. *Decennial Celebration, Worcester, Printed for the University*, 311-382.

**Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W. S. y Khvorova A.** (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nature biotechnology* **22**, 326-330.

**Rider M. H., Foret D. y Hue L.** (1985) Comparison of purified bovine heart and rat liver 6-phosphofructo-2-kinase. Evidence for distinct isoenzymes. *The Biochemical journal* **231**, 193-196.

**Rider M. H., Kuntz D. A. y Hue L.** (1988) Fructose 2,6-bisphosphate and its phosphorothioate analogue. Comparison of their hydrolysis and action on glycolytic and gluconeogenic enzymes. *The Biochemical journal* **253**, 597-601.

**Rider M. H., Crepin K. M., De Cloedt M., Bertrand L. y Hue L.** (1994) Site-directed mutagenesis of rat muscle 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: role of Asp-130 in the 2-kinase domain. *The Biochemical journal* **300** ( Pt 1), 111-115.

**Rider M. H., Crepin K. M., De Cloedt M., Bertrand L., Vertommen D. y Hue L.** (1995) Study of the roles of Arg-104 and Arg-225 in the 2-kinase domain of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase by site-directed mutagenesis. *The Biochemical journal* **309** ( Pt 1), 341-346.

**Riera L., Manzano A., Navarro-Sabate A., Perales J. C. y Bartrons R.** (2002) Insulin induces PFKFB3 gene expression in HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochimica et biophysica acta* **1589**, 89-92.

**Riera L., Obach M., Navarro-Sabate A., Duran J., Perales J. C., Vinals F., Rosa J. L., Ventura F. y Bartrons R.** (2003) Regulation of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway during myogenic C2C12 cell differentiation. *FEBS letters* **550**, 23-29.

**Rosa J. L., Perez J. X., Ventura F., Tauler A., Gil J., Shimoyama M., Pilkis S. J. y Bartrons R.** (1995) Role of the N-terminal region in covalent modification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: comparison of phosphorylation and ADP-ribosylation. *The Biochemical journal* **309** ( Pt 1), 119-125.

**Roy C. S. y Sherrington C. S.** (1890) On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J Physiol* **11**, 85-158.

**Sakurai T., Johnson J. H. y Uyeda K.** (1996) Islet fructose 6-phosphate, 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase: isozymic form, expression, and characterization. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 159-163.

**Sambrook J. y Russel D. W.** (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*,. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**Sanchez-Abarca L. I., Tabernero A. y Medina J. M.** (2001) Oligodendrocytes use lactate as a source of energy and as a precursor of lipids. *Glia* **36**, 321-329.

**Scott J. W., Hawley S. A., Green K. A., Anis M., Stewart G., Scullion G. A., Norman D. G. y Hardie D. G.** (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *The Journal of clinical investigation* **113**, 274-284.

**Schurr A., Miller J. J., Payne R. S. y Rigor B. M.** (1999) An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. *J Neurosci* **19**, 34-39.

**Semenza G. L.** (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews* **3**, 721-732.

**Shank R. P. y Bennett D. J.** (1993) 2-Oxoglutarate transport: a potential mechanism for regulating glutamate and tricarboxylic acid cycle intermediates in neurons. *Neurochemical research* **18**, 401-410.

**Shank R. P., Bennett G. S., Freytag S. O. y Campbell G. L.** (1985) Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Res* **329**, 364-367.

**Shimizu N., Matsunami T. y Onishi S.** (1960) Histochemical demonstration of ascorbic acid in the locus coeruleus of the mammalian brain. *Nature* **186**, 479-480.

**Sibson N. R., Dhankhar A., Mason G. F., Rothman D. L., Behar K. L. y Shulman R. G.** (1998) Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 316-321.

**Smith D., Pernet A., Hallett W. A., Bingham E., Marsden P. K. y Amiel S. A.** (2003) Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 658-664.

**Smith W. E., Langer S., Wu C., Baltrusch S. y Okar D. A.** (2007) Molecular coordination of hepatic glucose metabolism by the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6- biphosphatase:glucokinase complex. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **21**, 1478-1487.

**Sokoloff L., Reivich M., Kennedy C., Des Rosiers M. H., Patlak C. S., Pettigrew K. D., Sakurada O. y Shinohara M.** (1977) The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of neurochemistry* **28**, 897-916.

**Takahashi S., Driscoll B. F., Law M. J. y Sokoloff L.** (1995) Role of sodium and potassium ions in regulation of glucose metabolism in cultured astroglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4616-4620.

**Tietze F.** (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry* **27**, 502-522.

**Tominaga N., Tsujikawa T., Minami Y., Wu R. F., Watanabe F., Sakakibara R. y Uyeda K.** (1997) Effect of replacement of the amino and the carboxyl termini of rat testis fructose 6-phosphate, 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase with those of the liver and heart isozymes. *Archives of biochemistry and biophysics* **347**, 275-281.

**Tsacopoulos M. y Magistretti P. J.** (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* **16**, 877-885.

**Ui-Tei K., Naito Y., Takahashi F., Haraguchi T., Ohki-Hamazaki H., Juni A., Ueda R. y Saigo K.** (2004) Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic acids research* **32**, 936-948.

**Valero J., Weruaga E., Murias A. R., Recio J. S. y Alonso J. R.** (2005) Proliferation markers in the adult rodent brain: bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen. *Brain Res Brain Res Protoc* **15**, 127-134.

**Van Schaftingen E. y Hers H. G.** (1981a) Phosphofructokinase 2: the enzyme that forms fructose 2,6-bisphosphate from fructose 6-phosphate and ATP. *Biochem Biophys Res Commun* **101**, 1078-1084.

**Van Schaftingen E. y Hers H. G.** (1981b) Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 2861-2863.

**Van Schaftingen E., Hue L. y Hers H. G.** (1980a) Fructose 2,6-bisphosphate, the probably structure of the glucose- and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase. *The Biochemical journal* **192**, 897-901.

**Van Schaftingen E., Hue L. y Hers H. G.** (1980b) Control of the fructose-6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle in isolated hepatocytes by glucose and glucagon. Role of a low-molecular-weight stimulator of phosphofructokinase. *The Biochemical journal* **192**, 887-895.

**Van Schaftingen E., Davies D. R. y Hers H. G.** (1981a) Inactivation of phosphofructokinase 2 by cyclic AMP - dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **103**, 362-368.

**Van Schaftingen E., Davies D. R. y Hers H. G.** (1982a) Fructose-2,6-bisphosphatase from rat liver. *Eur J Biochem* **124**, 143-149.

**Van Schaftingen E., Jett M. F., Hue L. y Hers H. G.** (1981b) Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 3483-3486.

**Van Schaftingen E., Lederer B., Bartrons R. y Hers H. G.** (1982b) A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to a microassay of fructose 2,6-bisphosphate. *Eur J Biochem* **129**, 191-195.

**Vaughn A. E. y Deshmukh M.** (2008) Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nature cell biology* **10**, 1477-1483.

**Ventura F., Rosa J. L., Ambrosio S., Pilkis S. J. y Bartrons R.** (1992) Bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Evidence for a neural-specific isozyme. *The Journal of biological chemistry* **267**, 17939-17943.

**Vertommen D., Bertrand L., Sontag B., Di Pietro A., Louckx M. P., Vidal H., Hue L. y Rider M. H.** (1996) The ATP-binding site in the 2-kinase domain of liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Study of the role of Lys-54 and Thr-55 by site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* **271**, 17875-17880.

**Vicario C., Arizmendi C., Malloch G., Clark J. B. y Medina J. M.** (1991) Lactate utilization by isolated cells from early neonatal rat brain. *Journal of neurochemistry* **57**, 1700-1707.

**Vilchez D., Ros S., Cifuentes D., Pujadas L., Valles J., Garcia-Fojeda B., Criado-Garcia O., Fernandez-Sanchez E., Medrano-Fernandez I., Dominguez J., Garcia-Rocha M., Soriano E., Rodriguez de Cordoba S. y Guinovart J. J.** (2007) Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nature neuroscience* **10**, 1407-1413.

**Warburg O., Posener K. y Negelein E.** (1924) Ueber den Stoffwechsel der Tumoren (Reprinted in English in the book On metabolism of tumors by O. Warburg, Publisher: Constable, London, 1930). in *Biochemische Zeitschrift*, pp 319-344.

**Watanabe F. y Furuya E.** (1999) Tissue-specific alternative splicing of rat brain fructose 6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. *FEBS letters* **458**, 304-308.

**Watanabe F., Sakai A. y Furuya E.** (1997) Novel isoforms of rat brain fructose 6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase are generated by tissue-specific alternative splicing. *Journal of neurochemistry* **69**, 1-9.

**Westergaard N., Banke T., Wahl P., Sonnewald U. y Schousboe A.** (1995) Citrate modulates the regulation by Zn<sup>2+</sup> of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated channel current and neurotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 3367-3370.

**Wiesinger H., Hamprecht B. y Dringen R.** (1997) Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia* **21**, 22-34.

**Winder W. W. y Hardie D. G.** (1996) Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* **270**, E299-304.

**Yalcin A., Clem B. F., Simmons A., Lane A., Nelson K., Clem A. L., Brock E., Siow D., Wattenberg B., Telang S. y Chesney J.** (2009) Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *The Journal of biological chemistry*.

**Yudkoff M., Nissim I., Hummeler K., Medow M. y Pleasure D.** (1986) Utilization of [15N]glutamate by cultured astrocytes. *The Biochemical journal* **234**, 185-192.

**Zhu Z., Ling S., Yang Q. H. y Li L.** (2001) Involvement of the chicken liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase sequence His444-Arg-Glu-Arg in modulation of the bisphosphatase activity by its kinase domain. *The Biochemical journal* **357**, 513-520.

*“Todos esos momentos se perderán en el tiempo como  
lágrimas en la lluvia”*

**Blade Runner**

