



PAPEL DE AMPK EN LA REGULACIÓN DEL
METABOLISMO Y PROLIFERACIÓN CELULAR
DURANTE EL PROCESO DE TUMOROGÉNESIS

Marcos Ríos García

Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

*Este trabajo ha sido realizado con el apoyo del Ministerio de Ciencia e investigación por medio del programa nacional de formación de profesorado universitario (AP2006-03888)
Diseño de portada: Daniel Santos*



Dña. Rosa María Señarís Rodríguez, Catedrática de Fisiología y D. José Antonio Costoya Puente Profesor del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Papel de AMPK en la regulación del metabolismo y proliferación celular durante el proceso de tumorigénesis” elaborada por el Licenciado en Ciencias Biológicas Marcos Ríos García, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Fisiología de esta Universidad, y que, hallándose concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, a 20 de Junio de 2011.

Fdo. Rosa María Señarís Rodríguez Fdo. José Antonio Costoya Puente Fdo. Marcos Ríos García

Agradecimientos

A ti y a todos aquellos que no he citado y que merecen todo mi respeto

“Nec certam sedem, nec propriam faciem, nec munus ullum peculiare tibi dedimus, o Adam, ut quam sedem, quam faciem, quae munera tute optaveris, ea, pro voto, pro tua sententia, habeas et possideas. Definita caeteris natura intra praescriptas a nobis leges coercetur. Tu, nullis angustiis coercitus, pro tuo arbitrio, in cuius manu te posui, tibi illam prefinies. Medium te mundi posui, ut circumspiceres inde comodius quicquid est in mundo. Nec te celestem neque terrenum, neque mortalem neque immortalem fecimus, ut tui ipsius quasi arbitrarius honorariusque places et fctor, in quam malueris tute formam effingas. Poteris in inferiora quae sunt bruta degenerare; poteris in superiora quae sunt divina ex tui animi sententia regenerari.”

Pico della Mirandola
“*Oratio de hominis dignitate*”

Índice

Summary	5
Introducción	11
1. Ciclo celular	12
1.2. Rb y ciclo celular.....	13
2. Regulación del crecimiento y proliferación por rutas de señalización celular.....	16
2.1. Ruta de PI3K/Akt	17
2.1.1. PTEN	19
2.2. Ruta de Raf/MEK/ERK	20
2.2.1. Ras	22
3. Adaptaciones metabólicas en células tumorales	23
3.1. Metabolismo de la glucosa	24
3.1.1. Transporte de glucosa	24
3.1.2. Ruta de las pentosas	26
3.1.3. Glucólisis	26
3.1.4. Regulación del metabolismo de la glucosa por Ras y Akt	27
3.2. Metabolismo de lípidos	28
3.2.1. Las lipoproteínas	29
▪ Quilomicrones	30
▪ VLDL y lipoproteínas derivadas	30
▪ HDL	31
3.2.2 Los receptores de lipoproteínas	32
▪ Familia de receptores relacionados con LDLr	32
▪ Superfamilia ABC	33
▪ Superfamilia SCRC	34
3.2.3. Síntesis <i>de novo</i> de FA	34
▪ ACC	35
▪ FASN	36
3.2.4. Síntesis de lípidos	37
▪ GPAT	38
3.2.5. β -Oxidación	39
▪ CPT1	40
3.2.6. Regulación del metabolismo de lípidos por Ras y Akt	42
4. AMPK	45

4.1. Regulación de AMPK	45
4.2. Localización celular de AMPK	47
4.3. AMPK y metabolismo	48
4.4. AMPK ciclo celular y apoptosis	50
4.5. AMPK en cáncer	51
Objetivo	53
Material y métodos	55
1. Cultivos celulares	55
2. Infección retroviral y transfección	56
3. Bloqueo de receptores de lipoproteínas	58
4. Curvas de proliferación e incorporación de BrdU	59
5. Apoptosis y senescencia	60
6. Ensayo de tumorigénesis en ratones SCID	60
7. Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica	61
8. Extracción de proteína y fraccionamiento celular	62
9. PCR y RT-PCR	63
10. Western blot.....	65
11. Actividad de FASN	68
12. Actividad ACC-FASN	68
13. Síntesis de lípidos	69
14. Análisis estadístico de los resultados	69
Resultados	71
1. Deleción de <i>Pten</i> y expresión de Ras oncogénico en astrocitos de ratón como modelo experimental de tumores gliales	71
1.1. Caracterización de la deleción de <i>Pten</i> y expresión de Ras oncogénico	72
1.2. Metabolismo de lípidos extracelulares en presencia de Ras oncogénico y ausencia de <i>Pten</i>	74
1.2.1. Las lipoproteínas son la mayor fuente de lípidos para astrocitos que expresan Ras oncogénico y/o delecionan <i>Pten</i>	74
1.2.2. La actividad de VLDLr y LDLr es necesaria para mantener la viabilidad de células que expresan Ras oncogénico y/o delecionan <i>Pten</i>	77
1.3. Estado de la síntesis de lípidos y FA en presencia de eventos oncogénicos	81
1.3.1. La expresión de Ras oncogénico y/o deleción de <i>Pten</i> reduce la síntesis de lípidos en ausencia de lipoproteínas	82

1.3.2. Las células que expresan H-Ras ^{V12} y/o delecionan <i>Pten</i> presentan un bajo nivel de síntesis <i>de novo</i> de FA causado por la inhibición de la ruta a nivel de ACC	84
1.3.3. El aumento de los niveles de pAMPK en las células que expresan Ras oncogénico es responsable de la inhibición de la síntesis de FA	85
1.4. Papel de AMPK sobre proliferación	86
1.4.1. La expresión de H-Ras ^{V12} aumenta los niveles de pAMPK ^{Thr172} nuclear y la fosforilación de Rb	87
1.4.2. La inhibición de AMPK reduce el crecimiento celular	89
2. Deleción de AMPK y Expresión de Ras oncogénico como modelo experimental	91
2.1. Caracterización de la deleción de AMPK α y expresión de Ras oncogénico ...	91
2.2. La deleción de AMPK reduce el crecimiento celular	92
2.3. El efecto de la deleción de AMPK sobre proliferación está mediado por Rb ...	92
3. Papel de AMPK en líneas de glioma humano	94
3.1. Compuesto C inhibe la proliferación de líneas de glioma humano	94
3.2. El silenciamiento de AMPK reduce la proliferación en líneas celulares de glioma humano	96
3.3. Compuesto C reduce el crecimiento de gliomas humanos in vivo.....	97
3.4. El efecto de la inhibición de AMPK sobre proliferación de gliomas está mediado por Rb	98
Discusión	101
1. Activación de AMPK	102
2. Metabolismo de lípidos y AMPK	103
2.1. Lipoproteínas y AMPK	104
2.2. Síntesis de FA y AMPK	105
3. Proliferación, apoptosis y AMPK	106
3.1. Oncogénesis y AMPK nuclear	107
3.2. Rb, AMPK y proliferación	108
Conclusiones	111
Conclusions	113
Bibliografía	115

Abreviaturas

ACC:	Acetil-Coa carboxilase
ACL:	ATP citrate-lyase
AKT:	Protein kinase B
AMPK:	AMP depend kinase
Bad:	Bcl2-associated death promoter
β -Gal:	β -Galactosidase
BRAF:	Braf transforming
BrdU:	5-bromo-2-deoxyuridine
BSA:	Bovine serum albumin
ChREBP:	Carbohydrate response element binding protein
CPS-II:	Carbamoyl-phosphate synthetase 2
CPT1:	Carnitine palmitoyl transferase I
DMEN:	Dulbecco's modified eagle's médium
DTT:	Dithiothreitol
EDTA:	Ethylene diamine tetra-acetic acid
EGTA:	Ethilen-glicol-bis(b-aminoethylether) N,N,N',N'-tetracetic acid
eIF-4e:	Eukaryotic translation initiation factor 4E
Elk1:	ELK1, member of ETS oncogene family
ERK:	Extracellular-signal regulated kinase
FASN:	Fatty acid syntase
FBS:	Fetal bovin serun
FKH:	Forkhead
G6Pasa:	Glucose-6-phosphatase
GAP:	GTPase-activating protein
GEF:	Guanine nucleotide exchange factor
GFP:	Green fluoescent protein
Glut:	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (SLC2A1)
HIF:	Hypoxia inducible factor
HK:	Hexokinase
H-Ras:	Harvey rat sarcoma virus oncogene
HRE:	Hypoxic response element
INSIG:	Insulin induced gene 1
IP ₃ :	Inositol 1,4,5-trisphosphate
JNK:	c-Jun NH2-terminal kinase
KRas:	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LDH:	Lactate dehydrogenase
MDM2:	Mdm2 p53 binding protein homolog
MEK:	Mitogen-activated protein kinase kinase
Mnk:	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase
mTOR:	mammalian Target of Rapamycin
Myt1:	Myelin transcription factor 1
NADPH:	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NLS:	Nuclear localization signal
NRas:	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog

p300/CBP:	CREB binding protein
p90/RSK:	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa
PARP:	Poly(ADP-ribose)polymerase
PBS:	Phosphate buffered saline
PDK:	3-phosphoinositide dependent protein kinase
PEPCK:	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PFK:	Phosphofructokinase
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol 4,5-BisPhosphate
PIP ₃ :	Phosphatidyl inositol-3,4,5-triphosphate
PPAR:	Peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN:	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
Raf1:	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
RAS ^{V12} :	Ras mutant with Gly-12-to-Val
SCAP:	SREBF chaperone
SDS:	Sodium-dodecil-sulfate
SRE:	Sterol response element
SGLT:	Sodium/glucose cotransporter
SREBP:	Sterol regulatory element-binding protein
TBS:	Tris Buffer Salino
TBST:	Tris Buffer Salino + Twin20
TORC2:	CREB regulated transcription coactivator 2
VDAC:	Voltage-dependent anion-selective channel

Summary

Modifications in intermediary metabolism allow the maintenance of the high proliferation levels exhibited by cancer cells and are essential during the process of cell transformation and tumour progression. Although a connection between cellular metabolism and tumorigenesis was first proposed 100 years ago, the molecular mechanisms that interconnect the signalling pathways controlling metabolism and cell growth have only begun to be elucidated. One of the plausible links between cell metabolism and cancer is the fuel-sensing enzyme 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK). This kinase has a major role in the regulation of glucose, lipid and protein metabolism in response to stimuli such as changes in fuel availability, oxidative stress, heat shock and hormones. AMPK is a heterotrimer that contains one catalytic (α 1 or α 2), one regulatory (β 1 or β 2) and one AMP/ATP binding (γ 1, γ 2 or γ 3) subunit.

Decreases in the cellular energy state, as reflected by an increase in the AMP/ATP ratio, induces conformational changes in AMPK that makes it susceptible to phosphorylation and activation by AMPK kinases. Once activated AMPK restores energetic balance exerting direct effects on specific enzymes and transcriptional regulators stimulating catabolic pathways that enhance ATP generation and inhibiting others that consume ATP but are not necessary acutely for survival. Recent findings also pointed to a link between AMPK and cell growth but the function of AMPK in the biology of cancer is far from being understood.

The main objective of the present study was to give further insight into the role of AMPK in cancer cell metabolism and proliferation, evaluating the involvement of Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt signalling pathways. Both pathways have important roles in cell metabolism in normal and tumour cells. To accomplish this objective we used a murine and a human astrocytic tumour cell model, because constitutive activations of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT cascades are frequently found in human astrocytomas. We used different experimental approaches: primary mice astrocytic cell cultures expressing H-Ras^{v12} and/or *Pten* deletion, cultures of human glioblastoma cell lines, as well as human glioma xenografts in SCID mice. Here we showed that AMPK activation was essential to the proliferation of murine and human glioma cells by regulating cell metabolism, and promoting cell cycle progression.

We used a cellular model of mice glioma with astrocytes expressing oncogenic Ras and/or PI3K/Akt pathway activation by *Pten* loss. The expression of H-Ras^{v12} induced a great increase in cell growth. In contrast cells with *Pten* deletion did not exhibit significant changes either in growth ratio or in any of the parameters evaluated in this study. The astrocytes with oncogenic Ras showed an increase in the uptake of extracellular lipids probably due to an increase in the expression of the main lipoprotein receptors (VLDLr, LDLr, ABCG1) and a complete dependence of extracellular lipids to synthesize lipids and to grow. The absence of extracellular lipoproteins or the blockade of both VLDLr and LDLr prevented the stimulatory effect of H-Ras^{v12} on cell growth. To study further the metabolism of lipids in these cells we determined FAS, and ACC levels and activity. As suggested by others astrocytes with oncogenic Ras exhibited higher levels of a functional FASN enzyme. But our results showed an inhibition of ACC-FAS coupled activity due to a higher content of phosphorylated ACC in Ser79, which inhibits this enzyme. High levels of pACC^{Ser79} were found even in cells cultured

in a lipoprotein deficient medium. The main responsible for these readjustments of lipid metabolism was the activation of AMPK found in cells expressing oncogenic Ras. High levels of pAMPK were found not only after 7 days in culture, but also 24 hours after fresh new medium was added to the cells, indicating that oncogenic signalling pathways, but not hypoxia or glucose depletion, were responsible for this activation in our experimental setting.

A recent publication proposed AMPK as a Rb kinase in the residue serine 800, and demonstrated a biological effect of this kinase on cell cycle progression during brain mice development. We studied here whether in an oncogenic context AMPK was also involved in cell cycle regulation. We found that pAMPK was mainly localized in the cytoplasm of control cells, whereas H-Ras^{V12} expression induced an increase in pAMPK and pRb Ser800/804 nuclear levels. Altogether these data seemed to indicate a possible role of AMPK in cell cycle regulation by Rb phosphorylation in astrocytes with an activation of the Ras pathway. The plausible role of AMPK was further demonstrated by treating the astrocytes with compound C at concentrations that maintained cell viability in control cells. We found a reduced BrdU incorporation and decreased levels of pRb^{Ser800/804} in the H-Ras^{V12} expressing cells, illustrating the importance of the presence of an activated AMPK in the proliferation of cells with H-Ras^{V12}.

In order to analyze in more detail the relationship between AMPK, Rb and proliferation we used mice primary cultures of astrocytes with AMPK deletion, as previous reports had shown AMPK-independent effects of compound C. We studied the effect of AMPK deletion only in normal and H-Ras^{V12} expressing astrocytes. AMPK deletion reduced growth rate, and foci formation in cells that expressed H-Ras^{V12}, while no significant differences were found on proliferation levels in relation to control cells. Proliferation, senescence and apoptosis were determined in these cells. BrdU incorporation showed a significant reduction in H-Ras^{V12} expressing astrocytes when AMPK was deleted; a very low senescence increase was observed in cells with oncogenic Ras expression and AMPK deletion, whereas no change in apoptosis was detected among the different groups. Finally, our results in mice astrocytes showed a reduction in the levels of pRb^{Ser800/804} in AMPK deleted cells, in parallel to a decrease in ACC phosphorylation. This might explain the reduced rate of proliferation observed in AMPK deleted astrocytes, and confirms the important role of AMPK in maintaining the proliferation induced by H-Ras^{V12}.

To determine whether AMPK acted in a similar way in human glioma cells and in primary mice astrocytes expressing H-Ras^{V12}, we performed experiments of AMPK inhibition using two human glioblastoma cell lines: U87MG and U373MG. Previous reports had shown that these cell lines did not have mutations in the *Rb* gen. In order to inhibit AMPK in these cells we used two different approaches: treatment with compound C and incubation with AMPK siRNA.

Compound C blocked cell growth even in the U87MG cell line, which exhibits a more aggressive phenotype than the U373MG. This inhibitory effect of compound C suggested a similar mechanism of action of AMPK on cell cycle regulation in mice and in human gliomas. To further evaluate the mechanisms underlying this effect on cell growth we examined BrdU incorporation, senescence and apoptosis in both cell lines. Consistent with our previous results, compound C significantly reduced BrdU incorporation in both cell lines, with no effect on senescence or apoptosis. Moreover, we found lower levels of Rb phosphorylation in Ser807/811 (corresponding to Ser800/804 in mouse), in parallel to a pACC-reduced content in cells treated with compound C.

To firmly establish a direct relationship between AMPK inhibition, Rb phosphorylation and cell growth in these human glioma cells, we knocked down AMPK with a mixture of three different siRNAs targeting the catalytic subunits of AMPK ($\alpha 1$ and $\alpha 2$). U87MG and U373MG cells transfected with AMPK siRNA reduced significantly AMPK and pACC^{Ser79} levels. As it was demonstrated with compound C, AMPK knocked-down cells presented a significant reduction in BrdU incorporation, and a dramatic reduction in pRB^{807/811} levels. These data confirm the hypothesis for a role of AMPK in human glioma cell proliferation through a Rb-dependent mechanism.

We had showed that AMPK inhibition reduced cell growth in murine astrocytes expressing oncogenic Ras and in human glioma cell lines *in vitro*. However, stress conditions characteristic of a solid tumour microenvironment (hypoxia and metabolic stress) might be affecting the role of AMPK. To determine the plausible effect of compound C on the growth of human glioblastoma cells *in vivo*, we injected U87MG tumour cells in immunodeficient SCID mice. We chose this cell line because it is very tumorigenic *in vivo*, in contrast to U373MG cells, which it has been shown not to develop tumours in animals. Consistent with our *in vitro* findings, one single dose of compound C was able to reduce significantly U87MG tumour growth ratio. Furthermore, overall survival curves showed a significant difference between control

mice and those treated with compound C. The molecular analyses of the tumour samples showed a reduction in BrdU incorporation, and in the levels of pHistone in the animals treated with compound C, while no difference was found in the levels of cleaved caspase-3. Once again, and in agreement with our *in vitro* data showed that Rb phosphorylation was decreased in parallel with the reduced AMPK activity estimated by pACC^{Ser79} levels in U87MG tumours treated with the AMPK antagonist.

In summary, in normal cells AMPK is activated by different types of stress including nutrient deprivation or low O₂, and induce cell survival by cell metabolic adaptations and cell growth arrest. However some oncogenic situations, such as the presence of oncogenic Ras, activate AMPK, which promotes cell growth and proliferation by inhibiting ATP consuming pathways, which are not acutely necessary for cell cycle progression and by Rb phosphorylation.

By putting all these data together, we propose that the use of AMPK inhibitors might be a good therapeutic approach in glioma and in tumour cells with high levels of pAMPK.

Introducción

El metabolismo celular se define como la suma de todos los cambios químicos y físico-químicos que tienen lugar en la célula a fin de proporcionar energía y componentes básicos para procesos esenciales. Estos complejos mecanismos son la base de la vida y permiten el mantenimiento de la gran variedad de actividades de las células. El metabolismo puede dividirse básicamente en dos grandes grupos de reacciones: las denominadas reacciones catabólicas implicadas en degradar macromoléculas para liberar energía, y las reacciones anabólicas involucradas en sintetizar nuevas macromoléculas. Ambas rutas están interrelacionadas puesto que los productos de una son los sustratos de otra. Por este motivo y para evitar la existencia de ciclos fútiles, el metabolismo celular es un proceso muy regulado tanto a nivel celular como a nivel de organismo. Como consecuencia, la alteración de las rutas metabólicas está implicada en

un amplio rango de procesos patológicos que abarcan desde problemas alimenticios hasta patologías como el cáncer. Los primeros datos de alteraciones a nivel metabólico en células tumorales aparecieron en la década de los años 30 del siglo XX. Warburg^[1], describió una captación y catabolismo de la glucosa incrementado en estas células, que junto con una fosforilación oxidativa reducida se conoce como fenotipo glucolítico. Este hallazgo ha tenido una repercusión en la clínica al permitir desarrollar nuevas técnicas de visualización de tumores, que permiten localizarlos y delimitarlos de forma precisa^[1,2,3].

Aunque en un principio el estudio del metabolismo de células tumorales se había centrado casi exclusivamente en la glucólisis y la síntesis de ácidos grasos, hoy en día esta área de investigación se ha ampliado enormemente y son muchos los procesos y proteínas concretas las que se estudian, y que podrían tener una función relevante como la autofagia, el metabolismo de aminoácidos, AMPK (5'-AMP-activated protein kinase) y SIRT1 (Sirtuin 1). La gran mayoría de las alteraciones metabólicas son comunes a un amplio rango de tipos tumorales, lo que indica que las rutas oncogénicas presentan una estrecha relación con las rutas metabólicas. Diversos trabajos han confirmado esta hipótesis, mostrando que un gran número de proteínas implicadas en proliferación y transformación celular presentan la capacidad de regular rutas metabólicas^[5,6].

En este trabajo nos hemos centrado principalmente en estudiar el metabolismo de lípidos y en profundizar en el papel de AMPK como regulador de metabolismo y proliferación celular.

1. Ciclo celular

El ciclo celular es una secuencia organizada de procesos sucesivos mediante los cuales una célula crece en tamaño, replica su DNA, segrega los cromosomas en dos nuevos núcleos y se divide en dos células hijas.

Los mecanismos de restricción que se encuentran en la fase G₁, G₂ y M gobiernan las transiciones irreversibles del ciclo celular. De esta forma una célula en G₁ debe pasar un punto de restricción antes de comenzar la síntesis de DNA y entrar en fase S. El punto de restricción de la fase G₁ ha sido el menos estudiado de los tres puntos de control y en este se verifica el nivel energético de la célula, la disponibilidad de nutrientes y el volumen celular. Asimismo las células que han replicado sus cromosomas y se

encuentran en fase G_2 deben pasar un segundo punto de control, antes de entrar en fase M. En este punto se verifica que todo el DNA haya sido duplicado y que no contenga daños. El tercero de estos puntos de chequeo se encuentra en la fase M y se encarga de que todos los cromosomas aparezcan perfectamente alineados en el ecuador de la célula, de forma que previene la progresión del ciclo hasta que los cromosomas están alineados correctamente^[7, 8].

No pueden ocurrir inmediatamente dos divisiones sucesivas. Es necesario un tiempo G_1 donde la célula debe doblar la masa de citoplasma y para ello necesita mayor número de orgánulos, una mayor superficie de membranas, y más proteínas. Si esto no ocurre, en los sucesivos ciclos de división la célula se hará progresivamente más grande o más pequeña dependiendo de qué proceso sea el más rápido^[9, 10]. Esta inestabilidad del tamaño celular es incompatible con la vida. Sin embargo existen situaciones donde ocurre como son la embriogénesis (progresiva reducción del tamaño) o durante el proceso oncogénico.

Los mecanismos moleculares que condicionan estos procesos de control son complejos y no se conocen completamente. Sin embargo se han descrito distintos reguladores de ciclo celular tales como ciclinas-CDKs^[11], inhibidores y activadores de ciclo^[12]. Estos son los encargados de integrar las señales tanto extracelulares como intracelulares, para dar una respuesta apropiada en cuanto a la progresión del ciclo celular. Su acción final se basa en la regulación de Rb por modificaciones postraduccionales, de forma que esta proteína permita o no la transcripción de genes involucrados en fase S. Por este motivo la delección, mutación o hiperfosforilación de Rb son eventos comunes durante el proceso oncogénico.

Aunque Rb no presenta aparentemente una relación con el metabolismo celular, si es necesaria una regulación previa para que la célula presente los niveles energéticos y el tamaño suficiente como para ser viable tras la división.

1.2. Rb y ciclo celular

El control de la proliferación celular incluyendo la entrada en ciclo celular desde un estado quiescente G_0 , y el paso de G_1 a S es altamente dependiente del tamaño celular, estímulos mitogénicos y la ausencia de señales que bloqueen la proliferación. En

mamíferos Rb forma parte de la familia de pocket proteins, que consta de tres miembros estructural y funcionalmente relacionados: Rb, p107 y p130¹³. Rb es una fosfoproteína nuclear que regula la entrada en ciclo celular y que es controlado por quinasas (CDKs) que son activadas durante la transición de fase G₀ a G₁. La desregulación de varios componentes de este punto de control lleva a una proliferación acelerada que constituye la base del desarrollo de muchas formas de cánceres humanos ^[14, 15]. Numerosos estudios han establecido que el control de la función de factores de transcripción E2F por Rb es crucial para la regulación del ciclo celular^[16]. El número de factores de transcripción que componen la familia E2F es amplio (8) y difieren enormemente en su actividad pudiendo algunos inducir la progresión de ciclo celular por ejemplo E2F1 y otros tales como E2F8 presentar un efecto antiproliferativo^[17, 18]. La interacción entre Rb y los factores de transcripción E2F impiden la actividad transcripcional de estos últimos. Simplificando enormemente los mecanismos moleculares involucrados en la entrada en ciclo celular podría decirse que en respuesta a señales mitogénicas, los complejos ciclinas-CDKs inactivan a Rb mediante fosforilación, siendo necesarias la actuación de ciclina D-Cdk4/6 y ciclina E-Cdk2 para su completa inactivación^[19, 20]. La inactivación de Rb permite la liberación de los factores de transcripción E2F que actúan como activadores transcripcionales de genes importantes para la progresión de ciclo celular y síntesis de nucleótidos tales como ciclina E y dihidrofolato reductasa^[21].

Asimismo, diversas señales desencadenadas por luz UV, estrés replicativo, daño en DNA o señales de diferenciación desencadenan la activación de CDKIs (p21, p27, p19, p18, p16, p15) los cuales fosforilan e inactivan los complejos ciclinas-Cdks, impidiéndose la fosforilación de Rb y por lo tanto la progresión del ciclo celular^[22].

Rb aparece hiperfosforilado a partir del final de la fase G₁, y se mantiene en este estado durante la mayor parte del ciclo de división celular. De esta forma puede tener lugar la transcripción de genes implicados en la división. Durante el proceso de salida de mitosis, Rb se va progresivamente defosforilando para finalmente aparecer totalmente defosforilado en fase G₁ lo que impide la nueva entrada de la célula en el proceso de división hasta que nuevas señales fosforilen a Rb^[23].

La inhibición del ciclo celular mediada por Rb se basa en un efecto de represión transcripcional. Se conocen dos mecanismos por los cuales tiene lugar esta represión (Figura 1):

-La unión de Rb al dominio de transcripción de E2F bloquea su actividad transcripcional.

-El reclutamiento de los complejos Rb-E2F en la zona del promotor reprime activamente la transcripción^[24-26]. De esta forma los complejos Rb-E2F regulan la transcripción de genes de transición G1-S al modificar la estructura de la cromatina, por ejemplo mediante la unión de HDACs a los promotores y la posterior deacetilación de histonas^[27].

El importante papel de Rb en el control de ciclo celular puede verse reflejado en un gran número de tipos tumorales donde Rb aparece alterado o inactivo por diversos mecanismos, como son mutaciones directas sobre Rb, deleciones, inactivaciones de Rb por transformación oncogénica viral, así como también por mutaciones de CDKI^[28, 29]. Rb no sólo presenta un papel importante en la regulación del ciclo celular, sino que también regula diferenciación celular y apoptosis. Aunque no se conoce exactamente cómo lo lleva a cabo, en células diferenciadas se observan altos niveles de Rb. Así mismo Rb regula la diferenciación en distintos tipos celulares como son músculo, melanocitos, y macrófagos^[30-32]. El Rb acetilado por P/CAF parece ser el responsable de la función de Rb en diferenciación. Dicha acetilación aunque no afecta a la progresión de ciclo celular ni a la represión de la transcripción mediada por E2F, sí cambia su afinidad por otras proteínas que se acomplejan con Rb^[33, 34].

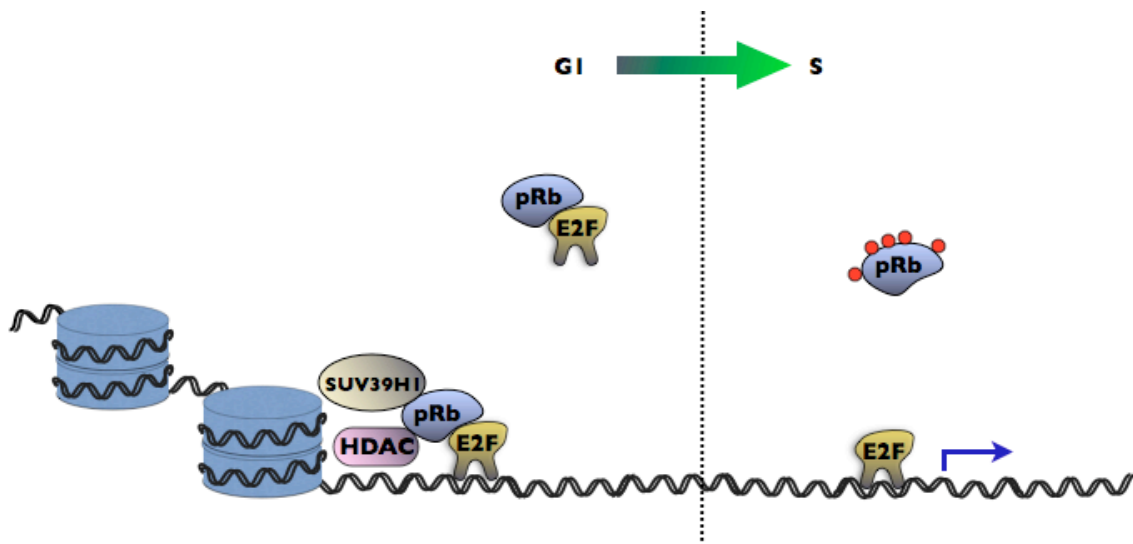


Figura 1: Mecanismos de regulación de la transcripción por Rb. Los puntos rojos indican fosforilaciones.

Adicionalmente, diversos trabajos han puesto de manifiesto un papel central de la ruta Rb/E2F en la regulación de la decisión celular de entrar en proliferación y apoptosis^[35-37]. Se ha observado que oncoproteínas virales tales como E1A, antígeno T y E7, las

cuales inactivan la función de Rb inducen la entrada en fase S pero también desencadena apoptosis dependiente de p53^[38]. Aunque se desconoce en parte como tiene lugar esta inducción de apoptosis mediada por Rb, se ha demostrado que E2F1 es el mediador entre Rb y p53 y que rutas de señalización en especial PI3K/Akt inhiben la inducción de apoptosis mediada por Rb/E2F1^[39, 40].

2. Regulación del crecimiento y proliferación por rutas de señalización celular

La proliferación, crecimiento y viabilidad celular están regulados por señales tanto extra como intracelulares, las cuales son integradas por rutas de señalización intracelulares para producir una respuesta adecuada de la célula a una situación concreta. Muchos son los procesos regulados por rutas de señalización, de hecho una única ruta de señalización puede tener efectos tan diversos como inducir la supervivencia o favorecer la apoptosis, y todo ello dependerá tanto de la propia ruta, del tipo celular o del estado en el que se encuentre la célula.

Dos de las rutas de señalización más ampliamente estudiadas por su relevante papel en proliferación, crecimiento y supervivencia han sido la de PI3K/Akt y la de Ras/MAPK (Raf/MEK/ERK)^[41-46]. Dado que ambas rutas aparecen frecuentemente activadas en un amplio rango de tipos tumorales, y se han relacionado también con la regulación del metabolismo celular^[47-49] han constituido el centro de nuestro trabajo.

Distintos grupos de investigación han comenzado a estudiar su papel en el metabolismo tumoral, y trabajos recientes han observado un papel muy importante de ambas rutas en la inducción de la “adicción” a la glucosa mostrada por células tumorales^[50, 51]. Estos trabajos han proporcionando nuevos puntos de vista, aumentando en gran medida la comprensión de la biología tumoral. A pesar de ello aún se desconocen muchas de las implicaciones de la activación de estas rutas en la regulación del metabolismo en un contexto tumoral.

2.1. Ruta de PI3K/Akt

Esta ruta es activada por un amplio número de receptores de membrana en respuesta a factores de crecimiento, citoquinas o hormonas, siendo los más importantes los receptores con actividad tirosin-kinasa. En mamíferos se conocen 3 isoformas de Akt (Protein kinase B) (Akt1, Akt2 y Akt3) y aunque presentan una estructura muy similar están codificados por tres genes distintos. Mientras que Akt1 promueve proliferación y supervivencia, Akt2 se ha asociado con procesos metabólicos en respuesta a señales tales como insulina. Asimismo la reducción de Akt3 se ha relacionado con la disminución del tamaño y el número de células. Todo ello sugiere un papel crucial de las isoformas de Akt en la regulación de muerte celular y proliferación^[52]. Diversos trabajos han mostrado que las distintas isoformas de Akt tienen efectos diferentes sobre tumorigénesis^[53, 54]. Así, mientras Akt1 presenta un papel importante en la inducción de la tumorigénesis, Akt2 está implicado en metástasis^[55, 56].

La actividad kinasa de Akt es dependiente de su fosforilación en treonina 308 y en serina 473. Estas fosforilaciones están mediadas por PI3K en respuesta a la activación de RTKs tales como IGF-1R, PDGFR, familia EGF/ErbB además de receptores acoplados a proteínas G triméricas o directamente por proteínas G monoméricas tales como Ras. A diferencia de Akt (un monómero con actividad serin/treonin-kinasa), PI3K es una proteína heterodimérica formada por una subunidad reguladora (frecuentemente p85) y una subunidad catalítica (la más conocida p110). La subunidad p110 tiene distintos dominios catalíticos. El más estudiado presenta actividad quinasa de lípidos, y fosforila a PIP₂ dando lugar a PIP₃. PIP₃ actúa como un segundo mensajero el cual es reconocido y unido por proteínas con dominios homólogos a pleckstrina tales como PDK-1 y Akt. La unión de PDK-1 a PIP₃ desencadena su autofosforilación y activación, provocando la transfosforilación de Akt así como de otras proteínas.

La fosforilación de Akt en Thr308 por PDK1^[57, 58] es seguida por un cambio conformacional el cual permite la fosforilación en Ser473 por mTOR-Complex 2^[59-63]. La activación de Akt desencadena diversos efectos (Figura 2) entre los cuales destacan los siguientes:

- Incrementa la resistencia a la apoptosis por ejemplo fosforilando a Caspasa-9^[41] y Bad^[42, 43], impidiendo que lleven a cabo sus acciones pro-apoptóticas.

- **Promueve el crecimiento celular** debido a la activación de la síntesis de proteínas mediada principalmente por la ruta de mTOR^[44], incrementa la glucólisis actuando tanto a nivel de transportadores de glucosa como sobre enzimas de la ruta, y aumenta la síntesis de ácidos grasos, efecto que veremos posteriormente en mayor profundidad.

La sobreactivación de Akt ha sido un efecto ampliamente descrito en distintos tipos de tumores. A pesar de ello mutaciones activantes o sobreexpresiones de Akt, no son eventos frecuentes en células tumorales^[64]. Por el contrario han sido descritas otras mutaciones en enzimas de esta ruta tales como PI3K y Pten.

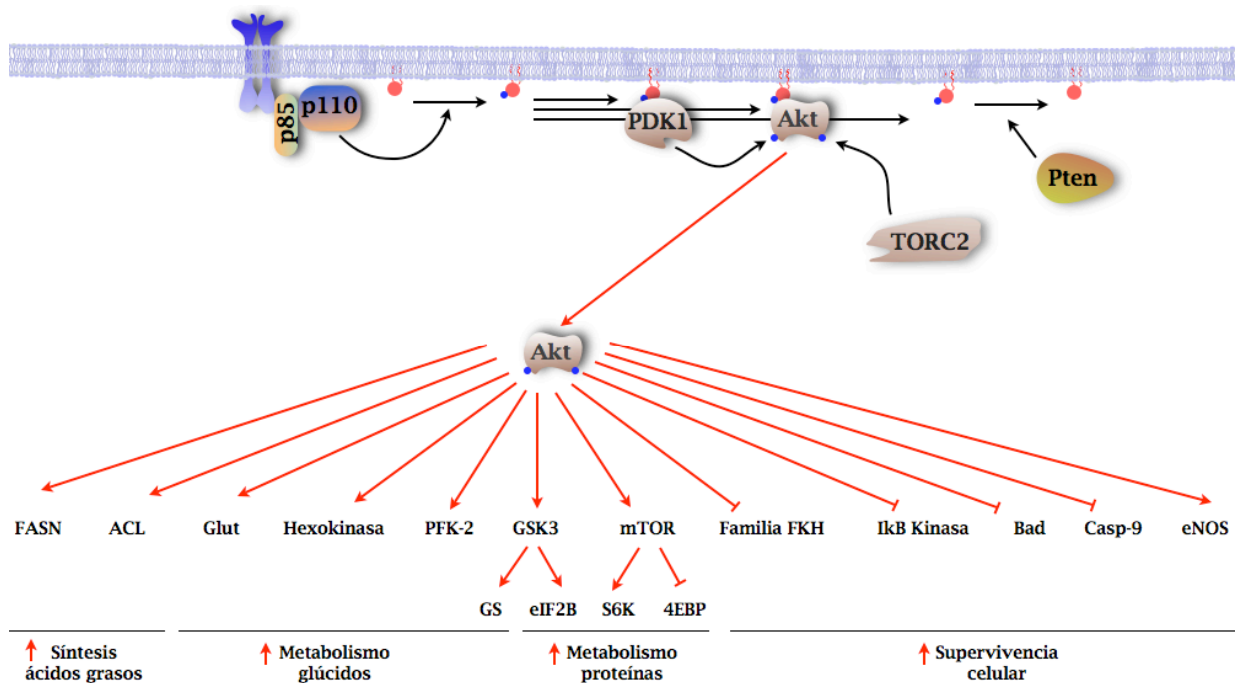


Figura 2: Representación esquemática del mecanismo de activación de AKT y algunas de sus dianas.

Pten tiene un papel central en la modulación de la ruta PI3K/Akt porque es la principal fosfatasa de PIP₃^[65]. La pérdida de este desencadena un incremento de los niveles de PIP₃ causando una hiperfosforilación de Akt y favoreciendo el proceso oncogénico^[66].

2.1.1. PTEN

El gen *Pten* fue identificado en 1997 como un potente supresor de tumores^[67-69] apareciendo mutado o delecionado en un amplio rango de tumores incluyendo los astrocitomas/glioblastomas^[70]. Se encuentra en la región 10q23.3 en humanos y codifica un polipéptido de 403 aa, formado por 4 dominios (Figura 3).

PTEN es una fosfatasa dual que actúa sobre lípidos y proteínas. La función mejor caracterizada de PTEN es su actividad fosfoinosítido-3-fosfatasa, mediante la cual defosforila a PIP₃ dando lugar a PIP₂^[71-74]. De esta forma PTEN tiene una función antagónica a la de PI3K y detiene la señalización de esta ruta. La reducción de los niveles de PIP₃ desencadenada por la actividad de PTEN inhibe tanto a Akt como a otras proteínas activadas por fosfoinositol. PTEN está regulado a distintos niveles. Presenta una regulación a nivel epigénético mediante metilación del promotor, pero también diversos factores de transcripción regulan su expresión. Así Myc^[75] y p53^[76] aumentan su transcripción, mientras que p300/CBP^[77] la reduce. Recientemente se ha demostrado que PTEN puede ser postranscripcionalmente regulado a nivel de mRNA por microRNAs específicos^[78]. Finalmente también presenta regulación a nivel proteico por fosforilación, acetilación y ubiquitinación^[79].

El elevado nivel de regulación al que aparece sometida esta proteína refleja su importancia para la célula. Así, la pérdida de heterocigosidad o una reducción en la expresión o estabilidad de la proteína es suficiente para promover tumorigénesis en modelos de ratón, además de afectar a otras funciones celulares tales como el metabolismo de lípidos y proteínas^[80-81].

En un principio se consideró la activación de Akt como la única consecuencia de la pérdida de PTEN, y para modelizar esta situación se utilizaron Akts con modificaciones activantes (dominios CAX y de miristilación). Sin embargo existen diferencias entre modelos que utilizan Akt constitutivamente activos o los que delecionan *Pten*. Esto se debe a que PTEN no inhibe directamente a Akt, sino que lo hace por medio de PIP₃. Por este motivo, la ausencia de PTEN activa a PDK-1 que fosforila y activa no solo a Akt sino a todos los miembros de la familia de quinasas AGC^[82-88]. También ha sido demostrado que PTEN directamente se asocia con p53 e incrementa su estabilidad^[89-92] y actúa sobre la migración celular defosforilando quinasas de adhesión celular^[93-95].

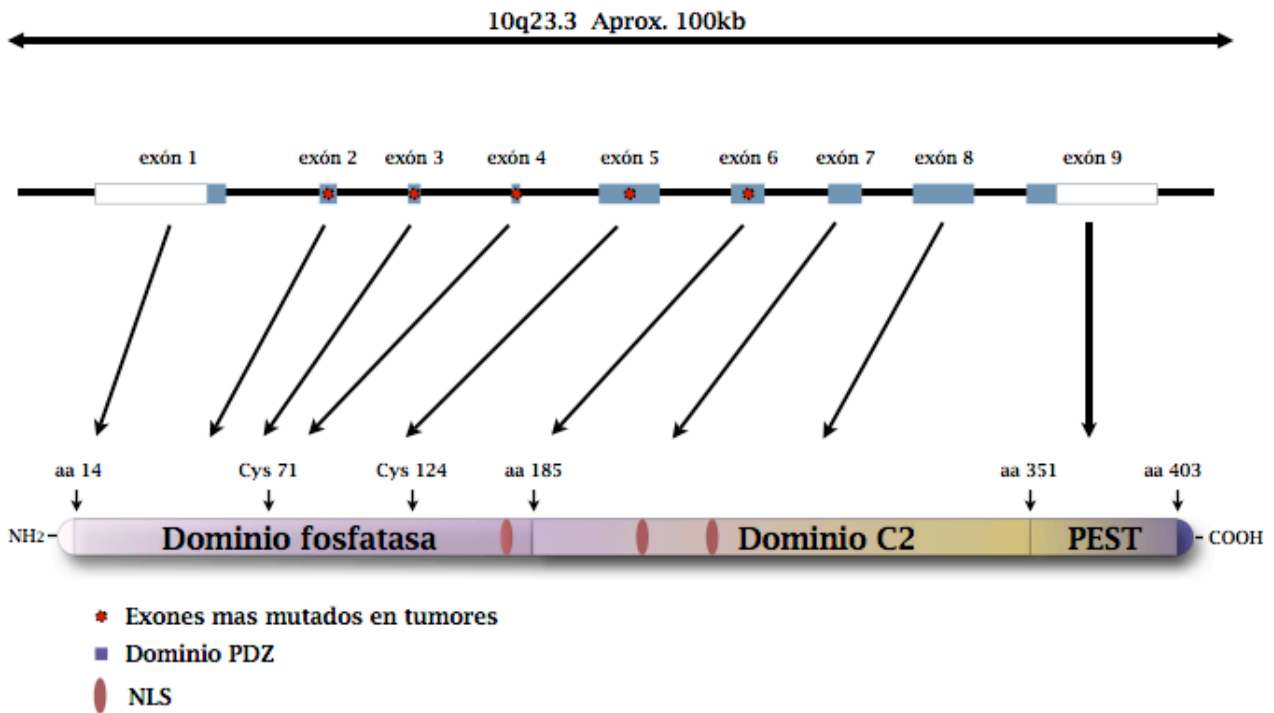


Figura 3: Esquema del gen *Pten*, y de PTEN, indicando sus dominios.

2.2. Ruta de Raf/MEK/ERK

Esta ruta es activada en respuesta a diversas señales extracelulares, y el efecto es mediado por un amplio número de receptores de membrana. La activación de RTKs y receptores acoplados a proteínas G permiten la unión de proteínas scaffold encargadas de reconocer a Ras. Una vez que Ras se activa por unión al GTP se inicia la cascada mitogénica activándose las rutas de las MAPKs (ERK, JNK, p38), así como la de PI3K/Akt. Mientras que la activación de Akt se ha relacionado con resistencia a apoptosis y crecimiento celular, la activación de ERK se ha asociado generalmente con proliferación y transformación^[96, 97]. La activación de las otras dos rutas de MAPK, JNK y p38, presentan implicaciones principalmente en respuesta a estrés^[98, 99].

Dentro de las tres rutas de MAPK la más conocida es la ruta de ERK, que es activada mediante la siguiente cascada de señalización: Ras activo recluta a la membrana y activa a la serin-treonin quinasa Raf1, la cual fosforila a MEK1, y éste a su vez fosforila

y activa a ERK1/2 (Figura 4).

Una vez Ras ha sido activada a través de los receptores de membrana indicados, puede llevar a cabo diversos procesos entre los que destacan:

- **incremento de la proliferación celular** mediante la fosforilación de Histona H3, lo que facilita la transcripción de genes de respuesta rápida necesarios para el crecimiento celular tales como Elk1. Por otro lado induce el progreso del ciclo celular actuando sobre distintas fases de éste. Promueve por ejemplo el paso de G₁ a S mediante la inducción de la expresión de Ciclina D1, así como también induce la activación de CDK1 requerida para el paso de G₂ a M, mediada por la inhibición de Myt1^[100].

- **aumenta la movilidad celular** produciendo cambios citoesqueléticos en las células mediante la activación de GTPasas de la familia Rho^[101].

- **incrementa el metabolismo celular** actuando a distintos niveles. Induce la síntesis de nucleótidos mediante la activación de CPS-II (*Carbamoyl-Phosphate Synthetase 2*), enzima clave en este proceso. También lleva a cabo un incremento en la síntesis de proteínas y esto está mediado por la activación de dos rutas: mediante Mnk que permite la activación de eIF-4e (factor de iniciación de la traducción necesario para que ésta tenga lugar) o mediante la activación de la ruta de Akt por reclutamiento a la membrana de la subunidad p110 de PI3K. Además se ha demostrado un aumento de la glucólisis y la lípogénesis directamente mediante la activación de ERK o por activación secundaria de la ruta de Akt^[102, 103].

De toda la superfamilia de proteínas G las oncoproteínas Ras han sido las más estudiadas, a causa de sus implicaciones en oncogénesis en humanos.

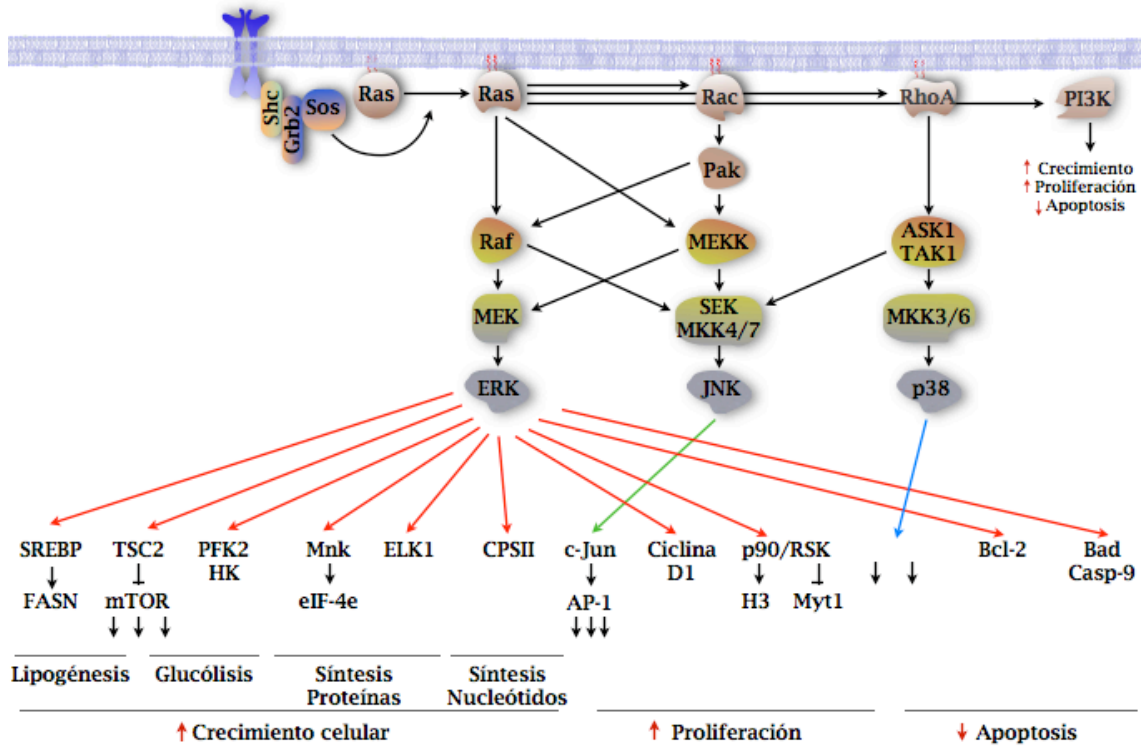


Figura 4: Activación de Ras y su implicación en la regulación de rutas intracelulares, señalando algunos de sus efectos biológicos.

2.2.1. Ras

Ras es una proteína G monomérica que forma parte de una superfamilia constituida por unos 100 miembros en humanos, y clasificados en seis familias: Ras, Rho, Arf, Rab, Ran y Rad^[104-109]. Las distintas familias están implicadas en procesos diferentes. Así, Ras está involucrada principalmente en proliferación y en el proceso de diferenciación, Rho controla la reorganización del citoesqueleto y migración celular, Rab regula el tráfico de vesículas sinápticas así como la expresión de genes implicados en la respuesta inmune, Arf actúa en la regulación del transporte vesicular, y Ran está implicada en el transporte nuclear.

Al igual que otras proteínas G, Ras presenta actividad GTPasa^[110]. Su actividad se basa en el mecanismo denominado ciclo GTP/GDP. Este proceso es regulado por las proteínas GAPs (*GTPase-Activating Proteins*) que incrementan la hidrólisis de GTP y proteínas GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) que estimulan el intercambio

de GDP por GTP.

Los genes Ras fueron originalmente identificados como oncogenes retrovirales en 1960/70 en virus de rata que producían sarcomas. En 1980 se descubrieron mutaciones que producían un Ras constitutivamente activo en tumores humanos^[111].

Hoy en día la familia Ras engloba un total de 39 isoformas codificadas por 36 genes. Existen 3 miembros de esta familia bien reconocidos: NRas, KRas y H-Ras, que son expresados de forma diferencial en los distintos tejidos^[104]. Diversos estudios han sugerido que mutaciones en KRas activan preferentemente la ruta de las MAPKs Raf-1/ERK1/2, que H-Ras activa preferentemente la ruta PI3K/Akt, y que mutaciones de NRas inducen una mayor resistencia a la apoptosis^[112-115].

Las mutaciones en Ras resultan generalmente en una pérdida de la actividad GTPasa y como consecuencia dan lugar a proteínas constitutivamente activas. En tumores humanos se han descrito mutaciones en las tres isoformas de Ras con una activación de la ruta Raf/MEK/ERK. La importancia de Ras en los procesos tumorales aparece reflejada en la elevada frecuencia con que ésta aparece mutada (30% de todos los tipos de cáncer humano)^[116].

3. Adaptaciones metabólicas en células tumorales

El continuo crecimiento y proliferación en células tumorales requiere una reprogramación del metabolismo de forma que le permita una producción continua de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La división celular es un proceso energéticamente muy costoso y sólo puede llevarse a cabo si las células tienen suficientes recursos metabólicos. Numerosos trabajos han demostrado un aumento en la capacidad glucolítica de las células tumorales, así como de los mecanismos de lipogénesis *de novo*, y de síntesis de proteínas. En los últimos años el estudio del metabolismo celular ha permitido obtener resultados muy interesantes que han abierto nuevas líneas de investigación en la biología del cáncer. De esta forma se conocen una gran variedad de enzimas implicadas en las diferentes rutas metabólicas que resultan afectadas de distintos modos por los procesos oncogénicos. Sin embargo lo más interesante en los cambios detectados durante la transformación celular en relación con el metabolismo es que son comunes a un amplio número de tipos tumorales, con diversos niveles de

agresividad y diferenciación. Esto parece indicar la necesidad de reajustes metabólicos en las células tumorales para poder mantener su viabilidad.

3.1. Metabolismo de la glucosa

La oxidación de la glucosa constituye una ruta metabólica fundamental para la obtención de ATP, de poder reductor y de precursores biosintéticos. El proceso comienza con la introducción de la glucosa en la célula mediante transportadores de membrana específicos, seguido por la fosforilación de la glucosa para inmovilizarla en su interior. Una vez la glucosa es fosforilada puede seguir tres rutas metabólicas:

- **Glucólisis:** implicada en obtención de energía
- **Ruta de las pentosas:** implicada en obtener poder reductor y precursores biosintéticos
- **Gluconeogénesis:** implicada en almacenar energía en forma de glucógeno

Dada su importancia en las adaptaciones del metabolismo de la glucosa en células cancerosas destacamos tres aspectos básicos de este proceso: el transporte a través de la membrana (necesario para introducir grandes cantidades de glucosa en la célula), la ruta de las pentosas (para obtener poder reductor y metabolitos necesarios para las rutas anabólicas), y la glucólisis (descrita como la mayor fuente de energía en células tumorales).

3.1.1. Transporte de glucosa

En eucariotas se diferencian dos tipos de proteínas transportadoras de glucosa: los cotransportadores de Na^+ /Glucosa (familia SGLT) y los transportadores de glucosa (familia Glut)^[117, 118].

Mientras que sólo tres miembros de la familia SGLT están implicados en el transporte de la glucosa, once de los catorce miembros de la familia Glut llevan a cabo este

proceso. Los diferentes miembros de la familia de transportadores Glut han sido ampliamente estudiados, observándose que presentan una expresión específica de tejido y que tienen diferentes características funcionales, tales como su especificidad de sustrato o su K_M ^[119]. Se clasifican en tres subfamilias en función de su secuencia (clase I, II y III).

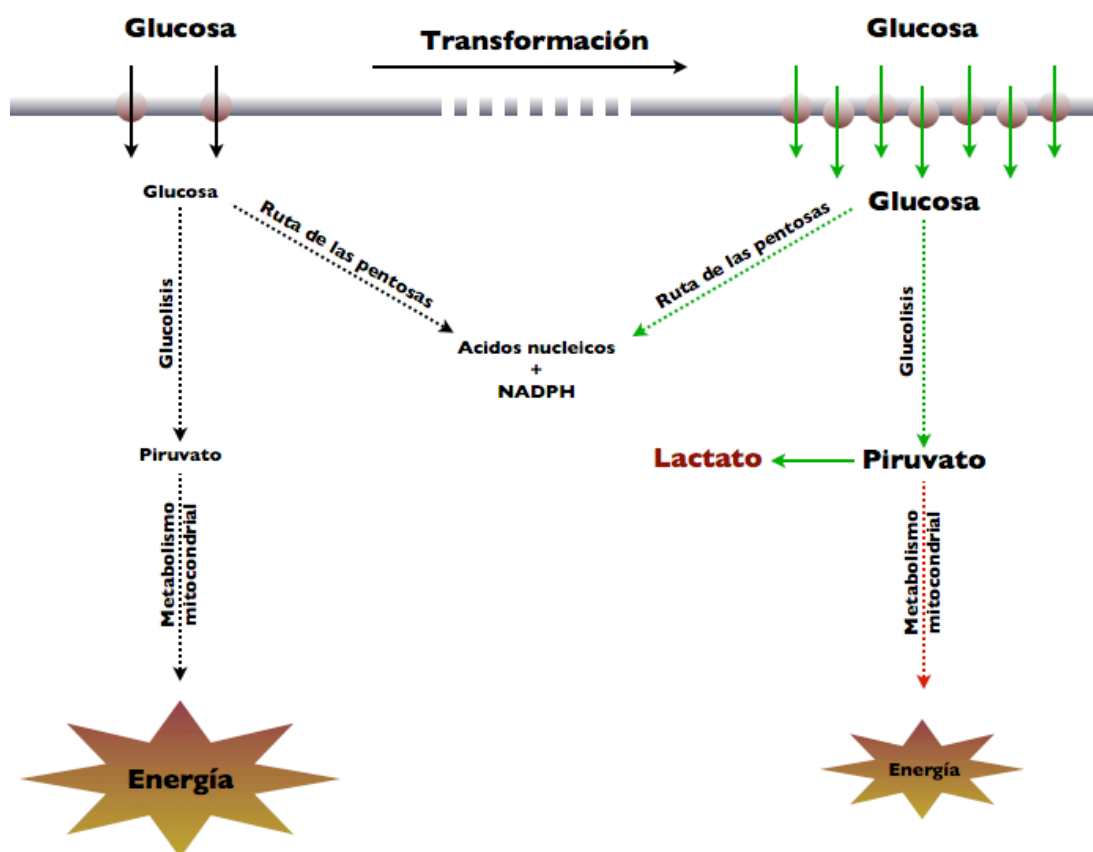


Figura 5: Representación esquemática del uso de la glucosa por células normales y por células transformadas. Las flechas verdes representan aumento de flujo por la ruta indicada, mientras que las rojas indican una reducción. Las flechas continuas indican la existencia de un único enzima implicado en el proceso mientras que las flechas discontinuas indican varios pasos enzimáticos.

De las tres clases de Glut la más relevante es la clase I, ya que agrupa los transportadores 1-4 y el 14, que son los que presentan mayor especificidad en el transporte de glucosa. De estos cinco transportadores Glut-1 y Glut-3 son los que presentan mayor afinidad por la glucosa y son responsables del transporte basal de la glucosa en la célula^[119]. Glut-2 es el que menor afinidad presenta por la glucosa, y también puede transportar fructosa^[120]. Glut-4 es específico de tejidos sensibles a insulina^[121]. Por último Glut-14 se considera una duplicación de Glut-3 y se expresa en el testículo^[122].

En numerosos tipos tumorales se ha demostrado un aumento de la entrada de glucosa en

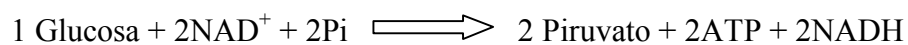
las células y un aumento en los niveles de expresión de distintos Glut, fundamentalmente Glut-1 y Glut-3^[123-134].

3.1.2. Ruta de las pentosas

La ruta de las pentosas se lleva a cabo en todas las células del organismo aunque en un nivel bajo, siendo la glucólisis la ruta predominante. En este proceso se producen moléculas clave para la biosíntesis de nuevos componentes en la célula. Se obtiene por un lado ribosa-5-P que es un elemento básico para la síntesis tanto de RNA como de DNA, y por otro 2 moles de NADPH por cada mol de glucosa, el cual actúa como donador de electrones en procesos de reducción necesarios en las rutas anabólicas. Aunque esta ruta así como su regulación está poco estudiada en cáncer, se ha descrito que los enzimas implicados en ella están incrementados en distintos tipos de tumores y en líneas celulares tumorales^[135-137].

3.1.3. Glucólisis

El proceso de glucólisis consta de una serie de reacciones de oxidación obteniéndose en último término piruvato (Figura 4), según la estequiometría de la reacción indicada:



En presencia de oxígeno el piruvato entra en la mitocondria donde es oxidado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) obteniéndose tanto coenzimas reducidos como ATP. Por último los coenzimas reducidos, derivados de estas reacciones, se transforman a ATP mediante la cadena de transporte electrónico siendo el resultado final H₂O, CO₂ y 32 moles de ATP por mol de glucosa. En condiciones de anaerobiosis el piruvato es transformado en lactato mediante la actuación de la LDH (*Lactate Dehydrogenase*) para eliminar el exceso de NADH reducido que se produce en las reacciones precedentes.

En numerosas células tumorales se ha descrito un fenotipo glucolítico, donde la

glucólisis está muy incrementada y el metabolismo mitocondrial aparece reducido. Este fenotipo glucolítico es necesario para incrementar la producción de moléculas precursoras que permitan la síntesis de nucleótidos, fosfolípidos y otros lípidos de membranas celulares, apareciendo en células tumorales a pesar de que no presentan defectos en proteínas de la fosforilación oxidativa o en la mitocondria^[138].

La existencia en células tumorales de una glucólisis anaerobia incrementada se conoce ya desde hace tiempo, y cabe destacar que dentro del conjunto de genes que aparecen incrementados con mayor frecuencia en células tumorales se encuentran aquellos que codifican proteínas involucradas en la glucólisis^[139]. Entre estas enzimas los más estudiados han sido: HK (*HexoKinase*), PFK (*PhosphoFructoKinase*) y LDH (*Lactate DeHydrogenase*). Además se ha descrito que estas proteínas también llevan a cabo otras actuaciones útiles para la célula tumoral como son la inhibición de la apoptosis^[140-142], o su posible papel en el incremento de la transcripción o la replicación del DNA^[143].

Aunque el fenotipo glucolítico en células tumorales es un hecho ampliamente descrito en la literatura y es común a la mayoría de los tumores, el mecanismo por el cual se desencadena está todavía poco esclarecido. Dentro de las cascadas intracelulares que regulan este proceso se encuentran las vías de Akt y Ras.

3.1.4. Regulación del metabolismo de la glucosa por Ras y Akt

Distintos estudios han demostrado que la activación de Akt es suficiente para incrementar la entrada de glucosa en la célula, así como para producir un fenotipo glucolítico, desencadenándose rápidamente la apoptosis cuando estas células son deprivadas de glucosa^[144]. De esta forma la activación de Akt se ha relacionado ampliamente con la translocación de Glut-4 a la membrana^[145], aunque también se ha visto que actúa sobre otros Glut como Glut-1^[146-148]. A nivel de la glucólisis se ha podido observar que la activación de la ruta de Akt actúa incrementando los niveles de HK y PFK, y favorece que la HK se asocie a la membrana mitocondrial.

Por otro lado también se ha descrito que el oncogén Ras activa tanto la entrada de glucosa en la célula como la glucólisis^[149], y estos efectos se han relacionado con HIF (*Hypoxia Inducible Factor*). Así tanto la expresión de Ras, como la inactivación de supresores tumorales tales como PTEN inducen la activación de HIF^[150, 151],

promoviendo la expresión de genes inducibles por hipoxia^[152]. HIF activo puede unirse a HRE e incrementar los niveles de transcripción de distintos genes, entre ellos los que codifican enzimas glucolíticas tales como LDH y PFK, así como los transportadores de glucosa Glut 1 y 3^[153-159].

3.2. Metabolismo de lípidos

Los lípidos constituyen uno de los sustratos más importantes para la obtención de energía en la célula mediante su entrada en la ruta de β -oxidación. Sin embargo desempeñan otras funciones importantes para la vida de la célula, tales como la formación de membranas celulares, la actuación como moléculas señalizadoras, y la modificación de proteínas.

Los lípidos pueden sintetizarse por dos vías denominadas lipogénesis y lipogénesis *de novo*. La única diferencia que existe entre ellas es la fuente de FA que pueden ser tomados de la dieta, o sintetizados a partir de los productos del metabolismo de la glucosa. El proceso de esterificación es común en las dos rutas. Dada la similitud de los términos y con el fin de evitar confusiones, diferenciaremos entre la síntesis *de novo* de FA (proceso en el que la célula sintetiza ácidos grasos libres a partir de la glucosa) y síntesis de lípidos (al proceso mediante el cual los ácidos grasos tanto exógenos como endógenos son esterificados).

La transformación celular también desencadena cambios en el metabolismo celular de lípidos. El proceso de síntesis *de novo* de FA es muy reducido en adultos, salvo cuando se ingieren dietas con grandes cantidades de hidratos de carbono y un porcentaje muy bajo de grasa (menor al 10% del aporte calórico total). En situaciones de dieta balanceada los ácidos grasos provienen de la dieta y la síntesis *de novo* de FA aunque tiene lugar en todos los tipos celulares del organismo, ocurre en un nivel muy bajo. Existen sin embargo tejidos especializados en realizar este proceso, tales como son el hígado y el tejido adiposo, en los que la regulación de esta ruta es llevada a cabo por hormonas, y factores de crecimiento. En contraposición con este hecho, se ha demostrado que numerosos tipos de células tumorales presentan un incremento en la síntesis *de novo* de FA^[160]. Dada la importancia de las adaptaciones del metabolismo de lípidos en células tumorales destacamos cuatro aspectos básicos de este proceso: el

transporte a través de la membrana, la síntesis *de novo* de FA, la síntesis de lípidos y la β -oxidación.

Dadas las características hidrofóbicas de los lípidos, éstos son insolubles en sangre, por lo que se transportan en forma de agregados lipoproteicos. Estos complejos se denominan lipoproteínas y están compuestos de apolipoproteínas, triglicéridos, colesterol, ésteres de colesterol y fosfolípidos.

3.2.1. Las lipoproteínas

Las lipoproteínas son estructuras esféricas que presentan un núcleo lipídico hidrofóbico (compuesto de triglicéridos y ésteres de colesterol) recubierto con una capa anfifílica cuyos componentes principales son los fosfolípidos, el colesterol no esterificado y las apolipoproteínas. Su función principal es el transporte de los distintos tipos de lípidos en la sangre. Según su composición cualitativa y cuantitativa en proteínas y lípidos se clasifican en tres grupos: los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y derivados, y las lipoproteínas de alta densidad. Asimismo en la mayoría de los vertebrados y considerando su densidad, las lipoproteínas se dividen a su vez en 6 tipos: (quilomicron, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de densidad intermedia (IDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), y lipoproteína de alta densidad de migración pre- β (Pre- β -HDL)).

El transporte de las lipoproteínas es un proceso dirigido, y en su metabolismo están implicados el intestino, el hígado y los tejidos periféricos. En el intestino, los enterocitos absorben los FA provenientes de la dieta los cuales son esterificados a triglicéridos e incorporados en los quilomicrones. La función básica de los quilomicrones es transportar los lípidos desde el intestino hasta el hígado aunque durante este transporte se van liberando FA que pueden ser usados por los tejidos periféricos. Una vez en el hígado, (órgano clave en el metabolismo de lípidos) los quilomicrones son transformados en nuevas lipoproteínas las cuales tienen como función transportar los lípidos a los tejidos periféricos. Esta vía involucra a las lipoproteínas VLDL, IDL y LDL. Finalmente, los tejidos periféricos captan FA liberados de estas lipoproteínas mediante la actividad de la LPL (**Lipo**Protein **Lipasa**),

así como también pueden endocitar la lipoproteínas mediante el uso de receptores específicos con el fin de obtener los lípidos que contienen. El colesterol también es transportado en las lipoproteínas, sobre todo en las LDL, y su incorporación en las células puede desencadenar efectos tóxicos a causa de su acumulación excesiva. Por este motivo las células de los tejidos periféricos presentan un transporte reverso del colesterol que permite la salida del colesterol de las células y la transferencia de este a las HDL. Las HDL son reconocidas y eliminadas por el hígado, donde el colesterol es transformado en sales biliares, y excretado hacia el intestino.

▪ Quilomicrones

Los quilomicrones son sintetizados en el intestino en respuesta a la ingestión de grasas, por lo que sólo transportan lípidos de origen exógeno. Aunque su composición proteica es variada, están formados principalmente por apolipoproteínas B48. Los quilomicrones forman parte de las lipoproteínas denominadas "ricas en triglicéridos" (TRLs), por el alto contenido de éstos y el contenido relativamente pobre de colesterol, presentando una muy baja densidad $<0.95\text{g/mL}$. Una vez en el torrente sanguíneo, los triglicéridos de los quilomicrones son hidrolizados por la LPL^[161]. La LPL es un enzima básico en el metabolismo de las lipoproteínas, y su papel principal es hidrolizar los triglicéridos para que puedan ser utilizados por tejidos periféricos sin tener que fagocitar la lipoproteínas. La hidrólisis de triglicéridos produce FA que pueden ser usados por los tejidos periféricos para obtención de energía así como para síntesis y reparación de membranas. Asimismo, los quilomicrones pueden interactuar con las HDL e intercambiar colesterol y otros lípidos. Finalmente son captados por el hígado mediante receptores específicos y este será el encargado de sintetizar los otros grupos de lipoproteínas.

▪ VLDL y lipoproteínas derivadas

A pesar de que las VLDL contienen una elevada proporción de triglicéridos al igual que los quilomicrones, difieren de estos en que son sintetizadas por los hepatocitos y la principal apolipoproteína es la B100^[161]. Las VLDL al ser secretadas a la circulación son sustrato de la LPL que libera los FA contenidos en los triglicéridos. La hidrólisis continua de los triglicéridos de las VLDL circulantes reduce su contenido lipídico, lo

que resulta en una reducción del diámetro y en un aumento de la densidad que al alcanzar los 300 Å y una densidad de 1.006g/ml, es considerada lipoproteína de densidad intermedia o IDL, también conocida como VLDL remanente^[161]. La hidrólisis subsiguiente de la IDL, por la acción conjunta de la LPL y de la LH (lipasa hepática), lleva a la formación de lipoproteínas de baja densidad o LDL con un diámetro inferior a 270 Å y una densidad >1.019g/mL. La LDL se caracteriza por un contenido relativamente elevado de colesterol en comparación con el contenido de triglicéridos^[138]. De hecho la LDL es la que transporta la mayor parte del colesterol que se encuentra circulante en sangre. Finalmente, las LDL en circulación son recuperadas por el hígado. Estos tres tipos de lipoproteínas también son usados por las células de los tejidos periféricos mediante su reconocimiento por receptores específicos, su internalización y su posterior degradación. La captación mediada por receptores es un proceso regulado por señales extracelulares que permite un rápido acceso a gran cantidad de lípidos (fosfolípidos, triglicéridos y colesterol).

▪ HDL

Las HDL son lipoproteínas de pequeño tamaño (entre 50 y 150 Å) y de densidad elevada (>1.063 g/ml). La síntesis de las HDL tiene lugar en el hígado e intestino, aunque también se ha descrito que otros tejidos periféricos pueden estar implicados en esta síntesis. A causa de su alto contenido en diversos lípidos y proteínas presentan una gran heterogeneidad. Las HDL se dividen en β-HDL y pre-β-HDL que se distinguen según la migración electroforética en geles de agarosa. La mayoría del colesterol transportado por las HDL se encuentra en la fracción β-HDL. A su vez las β-HDL pueden diferenciarse en dos grupos en función de su tamaño y densidad.

Las β-HDL son estructuras esféricas, mientras que las pre-β-HDL presentan forma discoidal, son relativamente más pequeñas que las β-HDL y son pobres en lípidos. Por este motivo las pre-β-HDL se consideran HDL inmaduras. El metabolismo de las HDL está íntimamente relacionado con el metabolismo de los lípidos contenidos en otras clases de lipoproteínas de densidad menor y mayor contenido de triglicéridos. En efecto, existe un intenso intercambio de constituyentes, tanto proteicos como lipídicos, entre las HDL y los Quilomicrones, las VLDL y las IDL. Sin embargo la característica más importante de las HDL es su implicación en la eliminación del colesterol celular.

Mediante receptores específicos para estas lipoproteínas las células de tejidos periféricos pueden unir HDL y mediante el proceso denominado transporte reverso del colesterol, desprenderse del exceso de colesterol, al mismo tiempo que captan otros lípidos.

3.2.2. Los receptores de lipoproteínas

Las lipoproteínas pueden liberar FA por medio de la acción de la LPL y LH y estos FA pueden ser incorporados en las células por difusión a través de la membrana. Sin embargo la interacción de las lipoproteínas con receptores específicos permite la obtención de una mayor cantidad de lípidos por las células.

Estos receptores tienen gran importancia tanto en la homeostasis de los FA como en la del colesterol. Se expresan en todos los tipos celulares, siendo el hígado y tejido adiposo las localizaciones más importantes en cuanto a su nivel de expresión. Aunque una de sus funciones es reconocer e internalizar lipoproteínas, esta no es la única. Se ha demostrado que pueden reconocer otras proteínas extracelulares, así como producir respuestas en señalización intracelular con efectos sobre la proliferación y movilidad celular^[162].

Los receptores de lipoproteínas constituyen un grupo de proteínas de membrana heterogéneo que incluye miembros de tres familias proteicas diferentes: la familia de receptores relacionados con LDLr, la superfamilia de proteínas ABC, y la superfamilia SCRC.

▪ Familia de receptores relacionados con LDLr

Esta familia de receptores constituye un conjunto de proteínas estrechamente relacionadas. Todos ellos son receptores de superficie celular que presentan diversas funciones en los diferentes órganos, tejidos y células. Estos receptores están implicados en procesos de endocitosis y transducción de señales^[163, 164]. El LDLr es el prototipo de esta familia que también incluye a VLDLr, ApoER2/LRP8, LRP1 y LRP1B, así como Megalina/GP330, SorLA/LR11, LRP5, LRP6, MEGF7 y LRP10. Se caracterizan por presentar los siguientes tres dominios en su región extracelular:

1) Dominio clase A del LDLr : son repeticiones ricas en cisteína que presentan un papel central en el metabolismo del colesterol, permitiendo la unión de las lipoproteínas al receptor.

2) Dominio clase B del LDLr : también conocido como motivo YWTD se encuentra en múltiples repeticiones en tándem formando las estructuras beta-propeller.

3) Dominio homólogo al lugar de unión de calcio de EGF: Está implicado en la interacción entre proteínas mediada por calcio.

El dominio intracelular es el más variable entre los miembros de la familia, y permite diferenciarlos en dos grupos: aquellos que presentan motivos NPxY (implicada en la internalización del receptor) tales como LRP1, LRP1B, ApoER2, LDLr, VLDLr, LRP9, LRP4 entre otros, y aquellos que presentan motivos PPPSP como LRP5 y LRP6 presentando así la capacidad de regular señales intracelulares en la ruta de Wnt/b-catenina. Aunque todos ellos pueden reconocer lipoproteínas, los de mayor importancia en este proceso son LDLr y VLDLr, ambos implicados en el reconocimiento de LDL y VLDL.

▪ **Superfamilia ABC**

Está formada por 48 miembros, todas ellas proteínas transmembrana muy conservadas filogenéticamente que son responsables de la translocación de un amplio número de compuestos a través de membranas celulares incluyendo el retículo endoplasmático, la mitocondria, los peroxisomas y la membrana plasmática^[165]. Las proteínas ABC se subdividen en 7 familias (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCF, ABCG y SUR). De todas ellas solo encontramos receptores implicados en el reconocimiento de lipoproteínas en la familia ABCA y ABCG. ABCG1 y ABCA1 median el eflujo de colesterol de células periféricas a HDL y juegan un papel muy importante en la eliminación del colesterol. ABCG5 y ABCG8 están implicados en la excreción de colesterol desde los hepatocitos al conducto biliar.

▪ Superfamilia SCRC

La superfamilia SCRC es un conjunto de proteínas secretadas y de superficie celular altamente conservadas. Solamente en el grupo B de las SRCR se encuentran proteínas que pueden unir lipoproteínas. Concretamente son SCARB1 y SCARB2 (Scavenger receptor clase B tipo1 y tipo2), que aunque se han descrito en macrófagos con implicaciones en la eliminación de lipoproteínas modificadas (oxidadas y glicosiladas), también se han encontrado en otros tipos celulares implicadas en el reconocimiento sobre todo de HDL.

Tanto la superfamilia SCRC como la ABC están implicadas con el transporte reverso de colesterol. Este transporte tiene una gran importancia para la célula pues su acumulo puede provocar efectos tóxicos. El eflujo de colesterol puede tener lugar de tres formas distintas:

-Difusión acuosa: Este proceso se basa en la difusión de moléculas de colesterol libre en medio acuoso, hasta que son absorbidas por un aceptor.

-Eflujo mediado por Scavenger receptor clase B: El movimiento de colesterol vía estos receptores (SCARB1 y SCARB2) es bidireccional y se parece al mecanismo de difusión acuosa, puesto que el movimiento del colesterol libre es dependiente de su gradiente de concentración^[166].

-Eflujo de colesterol mediado por transportadores ABC: A diferencia del transporte mediado por SCARB el movimiento de colesterol por estos receptores es unidireccional, y se cree que son los mayores responsables del transporte reverso de colesterol^[167].

Aunque la mayoría de los tipos celulares del organismo obtienen la mayoría de los lípidos mediante receptores de membrana, también presentan la capacidad de llevar a cabo la síntesis de estos. De esta forma partiendo de derivados de la glucosa pueden sintetizar FA mediante la ruta de síntesis *de novo* de FA.

3.2.3. Síntesis *de novo* de FA

La síntesis *de novo* de FA es una ruta clave para mantener la homeostasis energética en animales. Esta ruta está altamente controlada tanto por señales hormonales como por

condiciones nutricionales. Así una dieta rica en carbohidratos la activa mientras que los lípidos la inhiben. El hígado y el tejido adiposo son los dos grandes productores de ácidos grasos por esta vía, siendo estos utilizados por tejidos periféricos como fuente de energía y como componentes estructurales de membranas. La síntesis *de novo* de ácidos grasos ocurre en el citoplasma de la célula mediante la extensión secuencial de una cadena hidrocarbonada por sucesivas adiciones de acetilos en forma de Malonil-CoA. Para ello es necesario la actuación de tres enzimas: ACL (*ATP Citrate-Lyase*), ACC (*Acetil-CoA Carboxilase*) y FASN (*Fatty Acid Synthase*). La ACL permite obtener Acetil-CoA en el citoplasma de la célula. El Acetil-CoA es transformado, mediante la actuación de ACC en Malonil-CoA, y estos dos sustratos (Acetil-CoA y Malonil-CoA) son utilizados por FASN para sintetizar los ácidos grasos.

▪ ACC

En mamíferos existen dos isoformas de ACC (figura 5) denominadas como ACC1 y ACC2^[168, 169]. Estas isoformas son codificadas por secuencias que se encuentran en cromosomas distintos, localizándose ACC1 en el 17q21 y ACC2 en el 12q24.1. Estos genes codifican proteínas de 265 y 280 kDa, respectivamente, y se ha descrito que presentan diferencias en su expresión. ACC1 se localiza en tejidos lipogénicos a diferencia de ACC2 que aparece en tejidos no lipogénicos y en hígado^[169-171]. Su ubicación intracelular también es diferente. ACC1 se encuentra localizada en el citoplasma de la célula y está implicado en generar Malonil-CoA, que es usado por FASN para sintetizar ácidos grasos. ACC2 se encuentra localizada en la membrana mitocondrial externa, debido a la presencia de una secuencia hidrofóbica que no está presente en ACC1^[169, 171]. Esta localización de ACC2 se relaciona con la regulación que ejerce sobre CPT1 (*Carnitine Palmitoyl Transferase I*) mediante inhibición alostérica mediada por Malonil-CoA, lo que conlleva la inhibición de la β - oxidación^[172].

En mamíferos, a diferencia de procariontes, ACC está formado por un único polipéptido con tres dominios^[173] (figura 5), que cataliza la reacción de síntesis de Malonil-CoA en dos pasos. En primer lugar el dominio BC cataliza la carboxilación de la biotina mediante el consumo de ATP, y luego el dominio carboxil transferasa media la transferencia del grupo carboxilo de la biotina al Acetil-CoA dando como resultado Malonil-CoA. ACC es un enzima clave en la síntesis de ácidos grasos, ya que Malonil-

CoA es el factor limitante en este proceso, aunque también se ha relacionado con la síntesis de cuerpos cetónicos [174, 175].

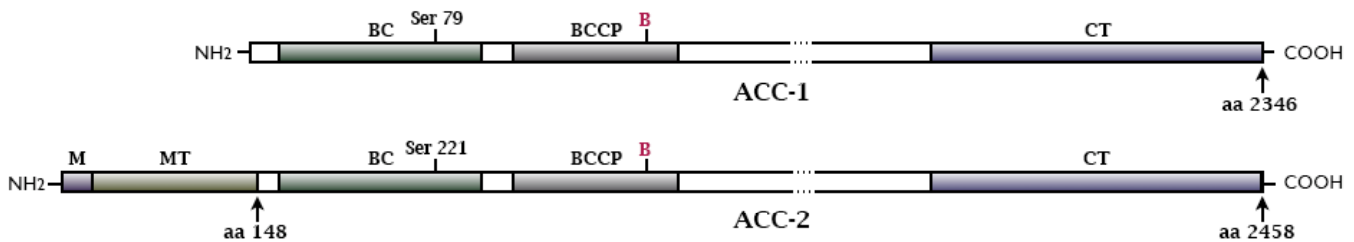
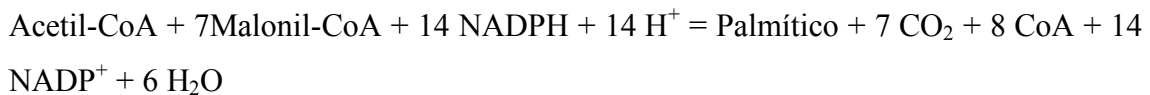


Figura 6: Ilustración comparativa entre ACC1 y ACC2. M (dominio de localización mitocondrial). MT (secuencia señal mitocondrial)

▪ **FASN**

FASN es un complejo multienzimático que lleva a cabo la síntesis de ácidos grasos mediante cuatro pasos: condensación, reducción, deshidratación y una segunda reducción. Los sustratos de este enzima son Acetil-CoA y Malonil-CoA, siendo también necesario el cofactor NADPH. Su actividad sigue la estequiometría que se indica a continuación:



En tejidos normales de adulto con una dieta balanceada, a excepción de hígado y tejido adiposo, los niveles de expresión de esta enzima son casi indetectables. En humanos está codificado por un gen situado en el 17q25, y al igual que en todos los mamíferos la proteína está formando un homodímero multifuncional de 250 kDa localizado en el citoplasma de la célula. Presenta siete actividades enzimáticas distintas concentradas en dos centros catalíticos, que le permiten llevar a cabo la síntesis de ácidos grasos. La energía en forma de poder reductor necesaria para sintetizar ácidos grasos es derivada del metabolismo de la glucosa mediante la ruta de las pentosas, y la reacción del enzima málico, aportando ambas NADPH a partes iguales.

En las células tumorales, a diferencia de células normales, se ha descrito una sobreexpresión de FASN, y/o un incremento de su actividad en un amplio rango de

tumores humanos^[176-188]. Por ello hoy en día se conoce a FASN como un antígeno oncogénico (OA-519). Su hiperactividad o sobreexpresión ocurre predominantemente en los tipos tumorales más agresivos, y la determinación de los niveles de FASN ha comenzado a usarse como un indicador pronóstico, llegando a proponerse como una posible diana terapéutica.

3.2.4. Síntesis de Lípidos

Los lípidos son moléculas complejas que presentan una gran diversidad. Existen lípidos destinados a reserva energética (triglicéridos), y lípidos estructurales. Los FA de estos últimos pueden estar esterificados con glicerol (glicerolípidos) o con ceramida (esfingolípidos), obteniéndose de esta forma una gran variedad de lípidos. Asimismo presentan diferentes grupos polares pudiendo estar constituidos por un glúcido exclusivamente en el caso de los esfinglípidos (glucolípidos) o por un grupo fosfato y un aminoalcohol (fosfogliceridos y fosfoesfingolípidos). Aunque existen tejidos donde los esfingolípidos aparecen en una gran proporción tales como el sistema nervioso, los lípidos mayoritarios son los derivados del glicerol. La síntesis de glicerolípidos es una ruta fundamental para el organismo puesto que están implicados en reserva energética, absorción de nutrientes, composición de la leche y metabolismo de fosfolípidos^[189-192]. En mamíferos existen dos rutas bioquímicas para la síntesis de estos compuestos. La ruta del monoacilglicerol que presenta un importante papel en la absorción de nutrientes en el intestino delgado, y la de glicerol fosfato que es responsable de la mayor parte de la síntesis de glicerolípidos a partir de ácidos grasos obtenidos en la síntesis *de novo*. El glicerol necesario para esterificar los ácidos grasos puede ser producido por vía de la glucólisis (glicerogénesis) o bien a través de la fosforilación del glicerol derivado de la lipólisis en el tejido adiposo o de la dieta^[193].

La enzima glicerolfosfato aciltransferasa (GPAT) lisofosfatidato aciltransferasa y diacilglicerol aciltransferasa acilan el glicerol dando lugar a la formación de ácido lisofosfatídico, diacilglicerol y triacilglicerol respectivamente. Los fosfolípidos resultantes son transferidos a membranas mientras que los triacilgliceroles son temporalmente almacenados en el citosol pudiendo ser movilizados a través de procesos de lipólisis y reesterificación^[194]. La síntesis de todos los glicerolípidos comienza con la

acilación de glicerol-3-fosfato con una cadena de acil-CoA para producir monoacilglicerol-3-fosfato. Esta reacción está catalizada por GPAT, la cual presenta la menor especificidad de todos los enzimas de la ruta de glicerol-3-fosfato sugiriendo que es el paso limitante de la ruta^[190].

▪ GPAT

En células de mamífero estudios enzimáticos demostraron la existencia de dos isoformas de GPAT, una isoforma microsomal sensible a NEM (N-ethylmaleimide) y otra mitocondrial resistente a este. Estas isoformas también podían ser distinguidas por su sustrato de preferencia de forma que la isoforma mitocondrial muestra preferencia por FA saturados mientras que la microsomal no presenta preferencia alguna. Datos recientes han demostrado que estas dos isoformas, definidas enzimáticamente, en realidad están codificadas por al menos cuatro genes conocidos, dos de los cuales codifican para proteínas mitocondriales mientras que otros dos codifican proteínas microsomales. En la mayoría de las células la ruta dependiente de GPAT es la más importante para la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos. Sin embargo existe otra ruta localizada en los peroxisomas mediante la cual se pueden sintetizar monoacilglicerol en ausencia de actividad GPAT^[190].

GPAT cataliza el paso inicial de la síntesis de glicerolípidos mediante la producción de ácido lisofosfatídico. Su actividad está basada en esterificar ácidos grasos activados en la posición sn-1 de glicerol-3-fosfato. De las cuatro isoformas conocidas en mamíferos solo GPAT1 mantiene su actividad en presencia de NEM. Esta proteína se localiza en la membrana mitocondrial externa y es altamente expresada en tejido adiposo e hígado, siendo relacionada su actividad con la síntesis de triglicéridos^[191, 192]. Existe otra isoforma asociada a la membrana mitocondrial (GPAT2), sin embargo es sensible a NEM. Esta isoforma fue descubierta en ratones KO para GPAT1^[193]. GPAT3 fue la primera aciltransferasa descrita en microsomas, y presenta poca homología con GPAT1, siendo mucho más parecida a monoacilglicerol aciltransferasas. No es resistente a NEM y presenta actividad GPAT. Presenta una alta expresión en tejidos lipogénicos tales como el tejido adiposo, siendo también abundante en corazón y pulmón^[191]. Por homología a GPAT3 fue identificado GPAT4 que también codifica una isoforma localizada en microsomas y sensible a NEM^[194, 195].

Todas estas proteínas se caracterizan por presentar dominios transmembrana, y un dominio GPAT (PF01553) con alta homología a bacterias.

El gen que codifica la GPAT1 mitocondrial fue caracterizada por mostrar un papel clave en la síntesis de glicerolípidos en el hígado. Sin embargo la actividad GPAT sensible a NEM ha sido demostrada ser la mas importante en la mayoría de tejidos de mamíferos, llegando esta a estar implicada en la síntesis del 90% del ácido lisofosfatídico^[189]. De las cuatro isoformas de GPAT conocidas sólo ha sido descrita la regulación de GPAT1. Esta proteína es regulada a nivel transcricional por insulina y cAMP y a nivel postraduccional mediante su fosforilación por AMPK y por casein-kinase 2^[196-201].

Dado que ha sido descrito en células tumorales una incrementada síntesis *de novo* de FA así como la necesidad continua de fosfolípidos para la síntesis de membranas, es logico pensar que pueda existir un aumento en la síntesis de monoacilglicerol mediado por GPAT. Aunque existen pocos trabajos al respecto, se ha demostrado que en algunos tipos tumorales existe un aumento de los niveles de GPAT^[202-203].

3.2.5. β -Oxidación

Los FAs no esterificados pueden ser oxidados para obtener energía en la mitocondria o en los peroxisomas. La oxidación intramitocondrial de ácidos grasos ocurre a través de la ruta de β -oxidación obteniéndose como resultado acetyl-CoA. Durante este proceso los electrones son transferidos a FAD y NAD formando las formas reducidas de estos coenzimas, los cuales son utilizados para la síntesis de ATP en la cadena de transporte electrónico. El acetyl-CoA puede ser oxidado completamente mediante el ciclo de ácidos tricarboxílicos, o puede ser dirigido hacia síntesis de otros compuestos. En la mitocondria no existen enzimas que puedan activar FAs de cadena larga (más de 14C) por su unión a CoA, por lo que tienen que ser importados desde el citosol mediante transportadores específicos^[204]. Este proceso es llevado a cabo por dos enzimas situadas una en la membrana mitocondrial externa denominada CPT-1 y otra situada en la membrana mitocondrial interna (CPTII). Sin embargo FA de cadena corta (menos de 12 carbonos) pueden atravesar la membrana mitocondrial y ser activados en la matriz por acil-CoA sintetasa (ACS), por lo que la oxidación de estos FAs no está controlada por CPT.

La oxidación de FAs también puede tener lugar en los peroxisomas. La β -oxidación en peroxisomas es responsable del metabolismo de cadenas de FAs muy largas mientras que la oxidación en la mitocondria está encargada de la oxidación de FA de cadena media y corta. En peroxisomas la reducción del NADH derivado del metabolismo de FA es oxidado directamente con la producción de H_2O_2 , por lo que la energía que se obtiene en esta ruta es menor que en el caso de la mitocondria. Sólo una pequeña parte de la oxidación de FA por las células se lleva a cabo en los peroxisomas^[205]. Asimismo existe una tercera ruta que permite la oxidación de FAs de cadena larga denominada ω -oxidación^[206]. El FA resultante de esta oxidación no puede ser usado por las mitocondrias pero si por los peroxisomas los cuales acortan la longitud del FA hasta que este puede ser metabolizado por la mitocondria.

▪ CPT1

Carnitine palmitoiltransferasa 1 (CPT1) cataliza la conversión de FA-CoA de cadena larga en acilcarnitina, que es la principal forma de transporte de FA desde el citoplasma a la matriz mitocondrial donde son dirigidos a β -oxidación. Este enzima no solo está implicado en el transporte de los FA dirigidos a β -oxidación, sino que también proporciona FA para otros procesos tales como la síntesis de lípidos complejos. Existen tres isoenzimas de CPT1 conocidas: CPT1 hepática (CPT1A) codificada por un gen situado en 11q13, CPT1 muscular (CPT1B) codificada un gen situado en 22q13, y CPT1 expresada en sistema nervioso (CPT1C) y codificada por un gen situado 19q13. CPT1A y B han sido extensamente estudiados desde que fueron clonados por primera vez en 1993 y 1995 respectivamente^[207, 208]. CPT1A está expresado de forma muy ubíca, exceptuando el tejido adiposo y músculo esquelético, mientras que CPT1B es expresado varios tejidos incluyendo tejido adiposo, músculo esquelético, cerebro y corazón. Ambas isoenzimas presentan diferencias significativas tanto en sus características cinéticas como en su regulación. CPT1A presenta alta afinidad por carnitina y baja por malonil-CoA^[209]. Tanto CPT1A como B están localizados en la membrana mitocondrial externa. Asimismo ambas isoenzimas presenta un papel crítico en la fisiología de tejidos tales como corazón, hígado y células β del páncreas habiendo sido propuestas como potencial diana terapéutica para el tratamiento de desordenes metabólicos.

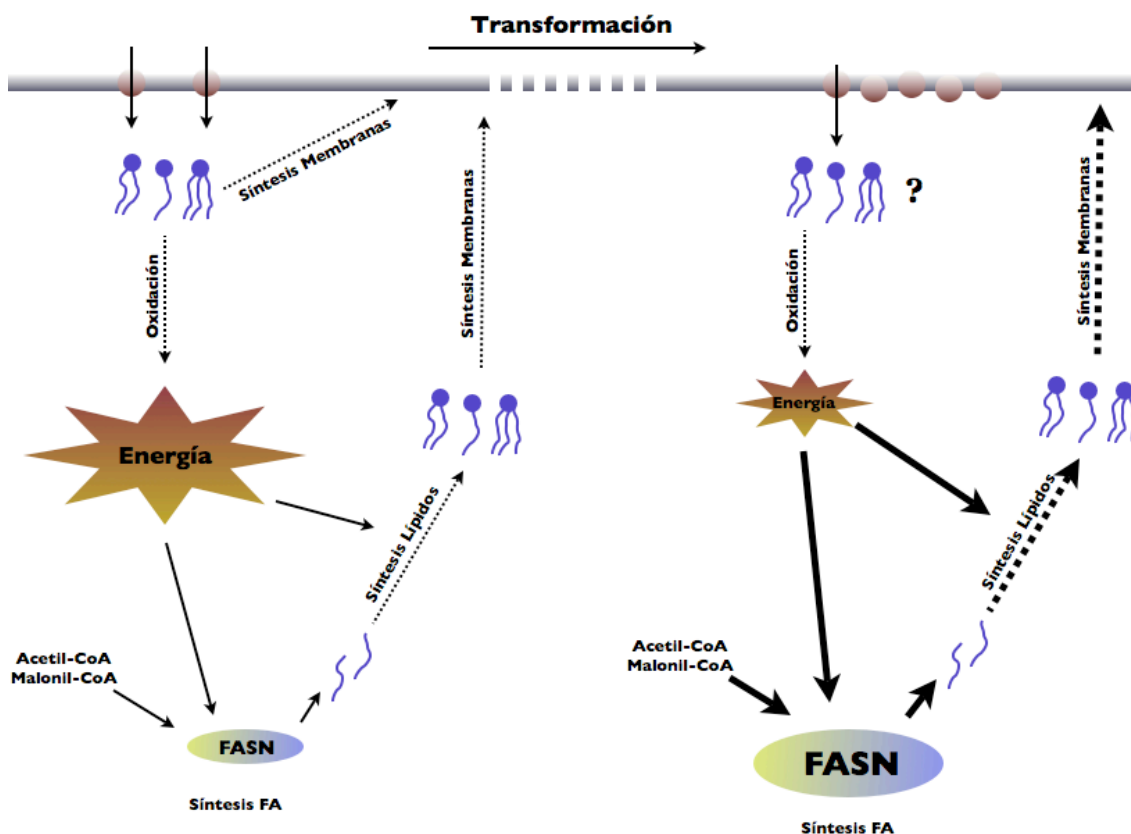


Figura 7: Ilustración comparativa entre una célula normal y otra transformada mostrando los cambios descritos a nivel del metabolismo de lípidos.

CPT1C fue el último miembro descrito de proteínas con actividad carnitín-palmitoiltransferasa^[210]. Su función es menos conocida que la de CPT1A y B, a pesar de que la secuencia proteica es altamente similar en todas ellas. Estudios de expresión han demostrado que CPT1C se localiza exclusivamente en el sistema nervioso central y en testículo. La capacidad de CPT1C de unir malonil-CoA ha sido demostrada y se ha sugerido que CPT1C regula el nivel de malonil-CoA disponible en el cerebro. Recientemente ha sido demostrado que esta isoenzima se localiza en neuronas y no en astrocitos, y que presenta al igual que CPT1A y B actividad carnitín-palmitoiltransferasa. Sin embargo esta isoforma se localiza en el retículo endoplasmático y no en las mitocondrias como había sido propuesto con anterioridad^[211].

CPT1 también presenta otros papeles además de su función en el metabolismo de ácidos grasos. Se ha descrito que interacciona con Bcl2, con implicaciones en apoptosis y supervivencia celular^[212,213]. Recientemente ha sido demostrado que CPT1 puede presentar un papel relevante en la biología de células tumorales. Asimismo se ha puesto de manifiesto la existencia de un aumento de los niveles de CPT1 en el núcleo de

células tumorales, proponiendo un posible papel de este enzima en la desacetilación de histonas y como consecuencia en la regulación de la expresión génica^[214].

3.2.6. Regulación del metabolismo de lípidos por Ras y AKT

La fisiología de las enzimas del metabolismo de lípidos ha sido estudiada ampliamente en hígado y tejido adiposo, donde está regulada por hormonas y metabolitos, sin embargo, en células tumorales es un campo aún poco conocido. La gran mayoría de los efectos de la activación de las rutas de Akt y Ras a nivel de metabolismo de lípidos están mediados por factores de transcripción SREBP. Se conocen tres SREBPs (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) denominados SREBP-1a, SREBP-1c, y SREBP-2 con una alta homología a nivel de secuencia^[215]. Todos ellos presentan un dominio N-terminal de transactivación, seguido por un motivo de unión al DNA (cremallera de leucinas), y por último dos dominios hidrofóbicos implicados en su localización en el retículo endoplasmático^[216].

Los SREBPs son sintetizados como precursores de alto peso molecular que necesitan ser hidrolizados para activarse. Sus formas inactivas se encuentran unidas a la membrana del retículo endoplasmático y para ser activas tienen que ser procesadas proteolíticamente dejando libre el dominio N-terminal, el cual se transloca al núcleo donde se une a SREs y activa la transcripción de múltiples genes diana. Cuando las concentraciones de esteroides son bajas, SREBP forma un complejo con SCAP (*SREBP Chaperone*) lo que permite el paso de estas proteínas desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi vía vesículas COPII. En el aparato de Golgi mediante dos pasos proteolíticos se deja libre el extremo N-terminal de SREBP de forma que puede translocarse al núcleo donde regula genes de la síntesis de ácidos grasos así como de colesterol^[217, 218]. Por lo contrario cuando los niveles de esteroides en la célula son elevados, INSIG (*Insulin Induced Gene 1*) se une a SCAP, impidiendo la formación del complejo SCAP/SREBP e inhibiendo tanto el movimiento hacia el aparato de Golgi como el procesamiento y activación de SREBP^[219] (Figura 8).

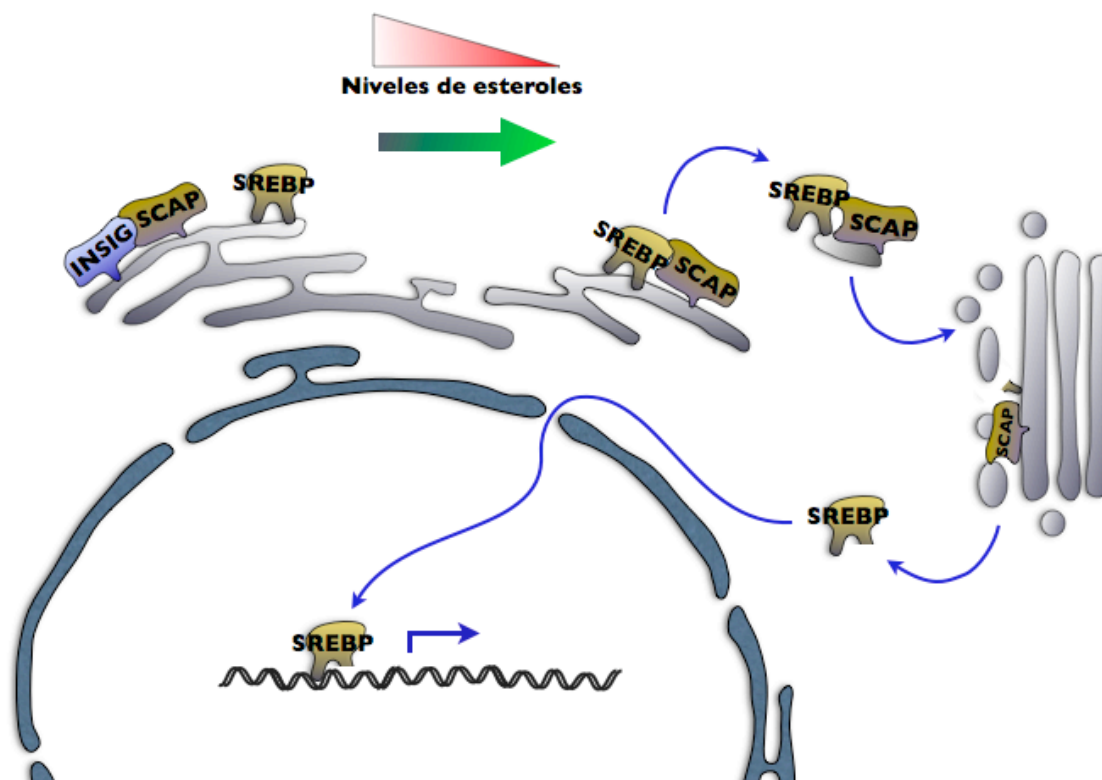


Figura 8: Representación esquemática del mecanismo de procesamiento de SREBPs y su translocación al núcleo.

El procesamiento de SREBP por la activación de la ruta de Akt ha sido ampliamente descrito^[220]. Sin embargo y aunque se ha demostrado este mismo efecto por la activación de la ruta de Ras el proceso no ha sido tan estudiado^[102].

SREBP aparece implicado en la expresión de los receptores de lipoproteínas y se ha demostrado que su activación incrementa los niveles de LDLr y SR-BI. Sin embargo la expresión de LDLr no solo está mediada por SREBP-1 y 2. De hecho se ha demostrado que la activación de ERK induce la expresión de LDLr de forma independiente de SREBP^[221, 228]. A diferencia de LDLr, la regulación de VLDLr y de los receptores implicados en el transporte reverso del colesterol (ABCG1 y SR-BI) se encuentran bajo la regulación de receptores nucleares tales como LXR, FXR o PPAR que pueden ser activados por Akt^[222-227].

Tanto los receptores nucleares como los PPAR están regulados por ligandos de carácter lipídico que pueden derivar de la síntesis *de novo* de colesterol y de FAs. La síntesis *de novo* de FAs es regulada a su vez por las rutas de Akt y Ras en distintos niveles.

Mediante la activación SREBP por la ruta de Akt desencadena el aumento de la transcripción tanto de ACC como de FASN^[229]. La ruta de Ras, aunque menos estudiada en relación al metabolismo de FA, también se ha relacionado con incremento en niveles de FASN, y se sabe que la interacción de SREBP con sus genes diana está mediada por la activación de ERK1/2^[102, 230].

La síntesis de lípidos también está regulada por estas dos rutas. De esta forma la actividad GPAT mitocondrial, concretamente GPAT1, aparece regulada por insulina. Este efecto está mediado por el procesamiento de SREBP, así como por la proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos ChREBP^[231, 232].

CPT-1 es el enzima clave en la regulación de la β -oxidación. Aunque no se ha descrito su regulación vía Ras o Akt, su expresión se encuentra bajo el control de factores de transcripción tales como TR y RXR^[233] o PGC-1^[234, 235]. Sin embargo Akt y Ras pueden inhibir a CPT-1 de forma indirecta mediante el aumento de los niveles de ACC y por lo tanto de malonil-CoA. (Figura 9).

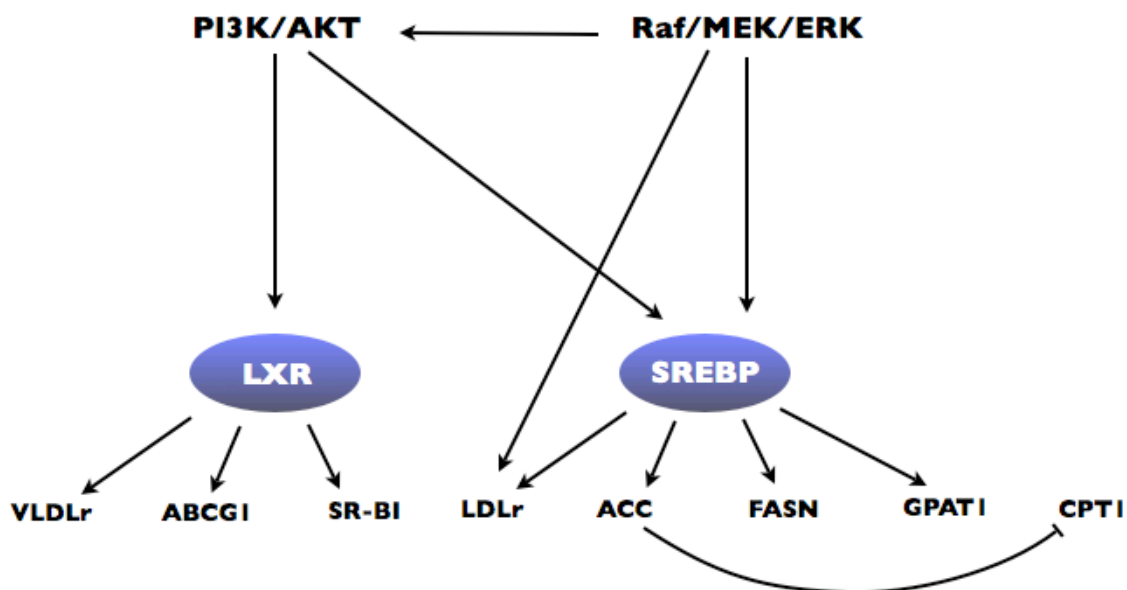


Figura 9: Ilustración mostrando algunos de los mecanismos de regulación del metabolismo de lípidos por medio de las rutas de señalización PI3K/AKT y Raf/MEK/ERK.

Como hemos visto tanto el metabolismo de la glucosa como el de lípidos aparece altamente regulado por la activación de las dos rutas oncogénicas descritas (Ras y Akt). En los últimos años han surgido nuevas propuestas para abordar el tratamiento tumoral usando para ello los cambios metabólicos que presentan estas células. En esta línea, se ha caracterizado un enzima capaz de responder a bajos niveles energéticos de las células

y actuar a nivel del metabolismo para restablecerlos. Este enzima es AMPK el cual ha sido propuesto como un posible supresor tumoral así como una diana terapéutica para el tratamiento de cáncer. Sin embargo su papel en la biología tumoral no ha sido esclarecido totalmente.

4. AMPK

AMPK forma parte de la subfamilia de protein-kinasas activadas por AMP/SNF1. AMPK es una proteína altamente conservada durante la evolución pudiendo encontrarse en la gran mayoría de los eucariotas con la única excepción conocida de *Endeplhalitozoon cuniculi*, el cual es un parasito intracelular obligado^[236]. Esta proteína es el mayor regulador de la homeostasis energética en la célula y coordina las rutas metabólicas con el fin de obtener un equilibrio entre la demanda energética y el aporte de nutrientes Su importancia en la célula se ha puesto de manifiesto en numerosos trabajos, ya que tanto en *Drosophila*^[237, 238] como en ratón (datos no publicados de Viollet Benoit) la perdida total de la actividad de AMPK desencadena letalidad embrionaria; la delección del ortologo de AMPK en levaduras imposibilita su crecimiento en medios pobres en glucosa^[239]; y en plantas primitivas AMPK es necesario para mantener el crecimiento cuando éstas son mantenidas bajo ciclos de luz/oscuridad^[240], ejerciendo la oscuridad el mismo papel que la ayuno en mamíferos.

4.1. Regulación de AMPK

AMPK se ha descrito como un sensor del metabolismo celular, que se activa en respuesta a depleción energética, y actúa regulando genes, y proteínas implicados en metabolismo, proliferación y apoptosis^[241, 242]. Sus efectos más estudiados han sido la inhibición de rutas anabólicas, activación de rutas catabólicas, parada de ciclo celular, e inducción de apoptosis. Por todos estos efectos se ha propuesto a AMPK como un sensor metabólico.

AMPK aparece en las células formando un complejo heterotrimérico, con una subunidad catalítica (α) y dos reguladoras (β y γ). Existen dos isoformas conocidas de la subunidades α y β , mientras que de la γ se han descrito tres. A causa de las distintas

combinaciones de las isoformas se han descrito 12 complejos heterotriméricos distintos, los cuales presentan diferencias en regulación, actividad y localización celular^[243, 244].

En el extremo N-terminal de la subunidad α está situado el dominio Ser/Thr quinasa del enzima, el cual presenta una zona altamente conservada que contiene una treonina (Thr172) que al ser fosforilado incrementa su actividad en unas 100 veces^[245]. Asimismo la subunidad α presenta un dominio de autoinhibición implicado en regular negativamente la actividad del enzima^[246, 247]. Finalmente en la región C-terminal de esta subunidad existe un dominio que permite la interacción con la subunidad β . Esta segunda subunidad actúa como un puente de unión entre la subunidad α y la γ , aunque también presenta un dominio de unión a glucógeno (CBD) que permite la localización del complejo enzimático en este polímero de carbohidratos^[248]. Finalmente la subunidad reguladora γ de AMPK presenta 4 dominios denominados CBS (Cystationin b-synthase) los cuales pueden unirse a dos moléculas de AMP o ATP de forma mutuamente excluyente así como un tercer AMP no intercambiable^[249]. La activación de AMPK tiene lugar por distintos tipos de estrés (bajos niveles de glucosa, hipoxia, choque térmico, ejercicio,...) que incrementan la relación AMP/ATP. Desde un punto de vista molecular AMPK se activa alostéricamente por unión de AMP, aunque también puede ser fosforilado por distintas quinasas incrementando su actividad^[250].

La unión de AMP a la subunidad γ de AMPK desencadena la activación del enzima por un complejo mecanismo que incluye una activación alostérica directa y favorece la activación por fosforilación en treonina 172^[251] de la subunidad α mediada por quinasas específicas. Trabajos recientes han sugerido que la unión de AMP inhibe la defosforilación del enzima lo que resulta en un incremento de su nivel de fosforilación^[252, 253]. Existen tres quinasas (LKB1, CaMKKII β , y TAK1) que han sido descritas como capaces de activar a AMPK por fosforilación de la subunidad α en treonina 172 incrementando de esta forma la actividad de AMPK (Figura 10). La quinasa pulmonar B1 (LKB1) fosforila y activa a AMPK incrementando en 100 veces su actividad, y por diversas evidencias se ha propuesto a AMPK como su principal efector^[254, 255]. AMPK puede ser activado también de forma calcio-dependiente, y esto es mediado por isoformas de CAMKK (calcio-calmodulin quinasa 2), sobre todo en tejido neural donde estas proteínas se expresan en un nivel elevado^[256, 257]. La fosforilación mediada por TAK1 (quinasa activada por el factor de crecimiento

transformante β) está menos documentada aunque está apoyada por resultados obtenidos en ensayos libres de células, así como en cultivos celulares^[258-260]. Como hemos visto AMPK también puede ser regulado mediante desfosforilación y aunque que no se conoce cual es exactamente la fosfatasa que lleva a cabo este proceso si se ha descrito que forma parte de la familia de fosfatasas PP2C^[253, 261].

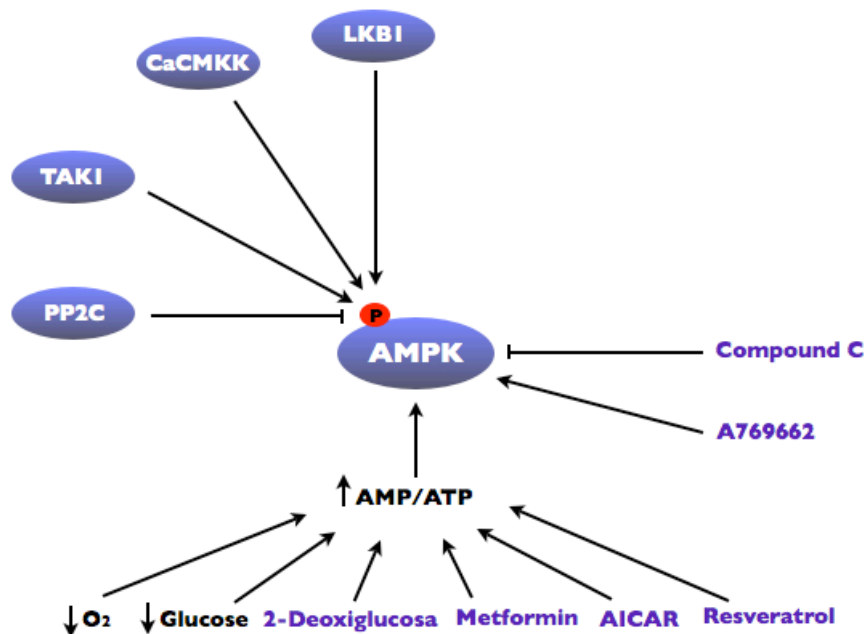


Figura 10: Mecanismos de activación/inhibición de AMPK por proteínas (círculos azules), por procesos fisiológicos (negro) o por compuestos sintéticos.

4.2. Localización celular de AMPK

La regulación de la actividad enzimática por localización celular es un mecanismo bien conocido y aunque se desconoce el efecto del cambio de localización de AMPK en la célula, si se sabe que éste tiene lugar. De esta forma se ha descrito que el homólogo de la subunidad α de AMPK en levaduras (snf1) está presente en el núcleo y regula la transcripción a través de la fosforilación de histonas^[262]. Trabajos pioneros del laboratorio de Hardie DG mostraron que los complejos AMPK de mamíferos conteniendo la subunidad $\alpha 2$ estaban al menos en parte distribuidos en el núcleo

celular^[243]. Este trabajo se extendió pudiendo demostrar que la subunidad $\alpha 2$ se transloca al núcleo en respuesta a la contracción muscular o al tratamiento con leptina^[263, 264]. No se conoce porque $\alpha 2$ es translocada al núcleo de la célula pero se ha visto que depende de la existencia de una señal de localización nuclear que no se encuentra en la subunidad $\alpha 1$ ^[264]. Recientes trabajos han demostrado que no solo la subunidad α puede translocarse al núcleo, sino que lo hacen también trímeros de AMPK^[265]. En relación con esto ha sido demostrado que la isoforma $\beta 1$ presenta una localización predominante nuclear en neuronas mientras que la $\beta 2$ en neuronas y la $\beta 1$ y $\beta 2$ en astrocitos presentan una localización citoplasmática^[266]. La subunidad $\beta 1$ puede ser fosforilada en distintos residuos de los cuales la fosforilación de las serinas 24, 25 y 182 están implicados en su distribución por la célula^[267]. Asimismo presenta una secuencia de miristilación que puede situarla en los distintos orgánulos celulares así como en la membrana plasmática^[268]. De esta forma distintas combinaciones de las subunidades de AMPK, así como la fosforilación, defosforilación o miristilación de ellas pueden determinar una u otra localización.

Dado que la activación de AMPK promueve su translocación al núcleo y que produce cambios en el patrón de expresión de diversos genes, no es aventurado hipotetizar que AMPK podría estar implicado en la regulación de proteínas nucleares implicadas en transcripción. En relación con esto, se ha demostrado que AMPK puede fosforilar a CREB, así como también es el mayor regulador de PGC-1 α , entre otros^[269, 270].

Estas posibles diferencias de localización pueden explicar los distintos y a veces contrapuestos efectos descritos tras la activación de AMPK en los distintos tipos celulares.

4.3. AMPK y metabolismo

La activación de AMPK puede regular distintos procesos en la célula. Concretamente a nivel metabólico actúa sobre el metabolismo de ácidos grasos, de la glucosa, y de la síntesis de proteínas, entre otros.

A nivel del metabolismo de ácidos grasos AMPK interviene incrementando la oxidación de lípidos e inhibiendo la síntesis *de novo* de estos. El incremento en la oxidación de

lípidos tiene lugar en parte debido a que AMPK incrementa los niveles de PPAR- α , implicado en la transcripción de genes que codifican proteínas involucradas en β -oxidación^[716, 272]. Asimismo se ha descrito que AMPK puede fosforilar directamente a PPAR- α aunque se desconoce la relevancia fisiológica de esta fosforilación. AMPK también actúa inhibiendo la síntesis *de novo* de ácidos grasos y lípidos tanto a nivel transcripcional como postraduccional. Así actúa disminuyendo la síntesis de enzimas implicadas en la lipogénesis, por medio de la regulación de los factores de transcripción SREBP y ChREBP^[273]. También puede actuar directamente sobre enzimas de la síntesis de ácidos grasos. Fosforila a ACC1 en las Ser77 y Ser79, a ACC2 en las Ser219 y Ser221, y posiblemente a FASN inhibiéndolos^[341]. De esta forma tiene lugar una disminución en la lipogénesis, así como un incremento de la β -oxidación^[274].

A nivel del metabolismo de la glucosa AMPK actúa incrementando la glucólisis, e inhibiendo la gluconeogénesis. Se ha descrito que regula la glucólisis actuando, por ejemplo, sobre GEF, el cual está implicado en la transcripción de Glut-4. AMPK fosforila a GEF de forma que este incrementa su afinidad por el promotor de Glut-4 y aumenta su nivel de transcripción^[275-277]. La disminución en la gluconeogénesis mediada por AMPK tiene lugar mayormente por la fosforilación del complejo TORC2. Cuando TORC2 se fosforila no puede entrar en el núcleo e interactuar con CREB coactivándolo, por lo tanto, no tiene lugar la expresión de los genes regulados por estas proteínas, tales como G6Pasa, y PEPCK (implicados en gluconeogénesis)^[276]. De esta forma se reduce la síntesis de glucosa en la célula (Figura 11).

Asimismo AMPK también regula el metabolismo mitocondrial siendo su mayor efector el factor de transcripción PGC1 α . AMPK directamente fosforila y activa este factor de transcripción el cual está implicado en la transcripción de genes implicados en la fosforilación oxidativa y biogénesis mitocondrial.

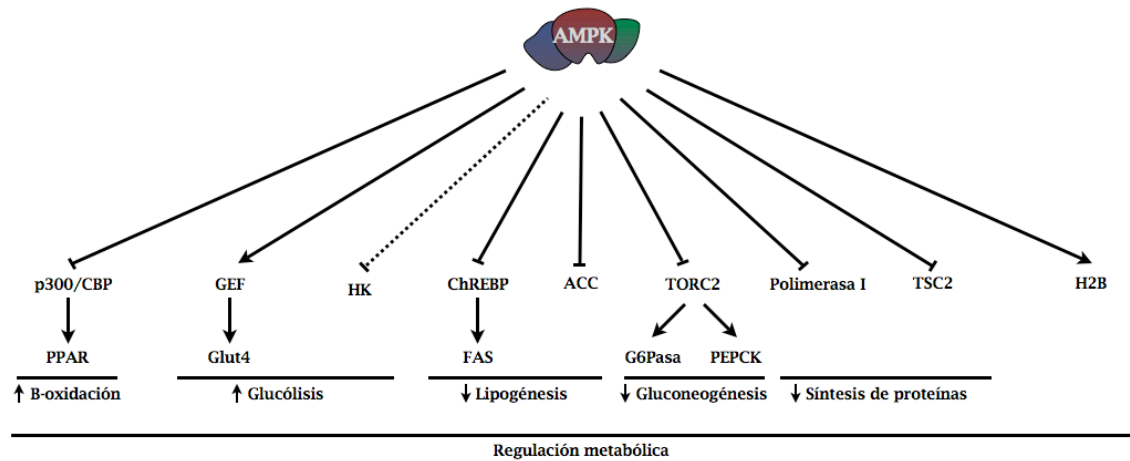


Figura 11: Algunas de las dianas sobre las que actúa AMPK, y sus principales efectos biológicos en las células. Las flechas de trazo continuo indican una regulación directa, mientras que las de trazo discontinuo indican una regulación mediada por otros enzimas.

La síntesis de proteínas es regulada por AMPK de varias formas. Isoformas del complejo AMPK que contienen la subunidad $\gamma 3$ aparecen localizadas en el nucleolo, reduciendo la actividad de la RNA Polimerasa I, lo que implica una disminución de la síntesis de los rRNAs que forman parte de la estructura básica de los ribosomas, y por consiguiente la síntesis de proteínas^[278]. Otro mecanismo por el cual AMPK actúa inhibiendo la síntesis de proteínas es produciendo una fosforilación activadora sobre TSC2. De esta forma se inhibe la ruta de mTOR y por lo tanto la síntesis de proteínas. Todos estos efectos llevados a cabo por AMPK a nivel del metabolismo tienen como fin último reducir el gasto energético en la célula para de esta forma restablecer los niveles energéticos y favorecer la supervivencia de ésta.

4.4. AMPK, ciclo celular y apoptosis

Tanto el ciclo celular como la apoptosis pueden ser regulados por AMPK y este efecto está mediado, al menos en parte, por la regulación de p53^[279]. En condiciones normales p53 es ubiquitinado y degradado rápidamente, mientras que cuando es fosforilado incrementa su estabilidad, impidiendo su degradación y de esta forma puede actuar inhibiendo el ciclo celular e induciendo la apoptosis mediante la regulación de distintos genes. Cuando AMPK se activa, actúa sobre p53 y lo fosforila en la Ser15 incrementando su estabilidad. Ello conlleva un aumento de los niveles celulares de

p21^{waf1/cip1}^[290, 291], lo que induce una parada en el ciclo y/o la muerte celular. Asimismo la inhibición del ciclo celular también se ha relacionado con la inhibición de mTOR mediada por AMPK^[292].

Trabajos recientes han descrito otras funciones AMPK. Se ha demostrado que AMPK es necesario en células de drosófila para mantener la polaridad celular, la segregación cromosómica y la estabilidad genómica. La delección de AMPK en este organismo desencadena la pérdida de polaridad en células epiteliales e induce la formación de células poliploides^[293]. Estos efectos se han asociado a la capacidad de AMPK de fosforilar a MRCL^[294]. Aunque en células humanas también se ha podido constatar que AMPK presenta un papel en la mitosis puesto que se localiza en el aparato mitótico junto con otras proteínas implicadas en segregación de cromosomas y en finalización de la división celular, no se conoce cuál es su papel concreto en este proceso^[295]. Otros trabajos también han observado que AMPK es necesario para la maduración de oocitos de mamífero y su activación ayuda a promover la meiosis^[296]. A nivel molecular se ha demostrado que la activación de AMPK regula el ciclo celular a través de su acción sobre el inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas p27kip1^[297]. Asimismo AMPK también regula el ciclo celular actuando de forma directa sobre Rb y β -catenina^[298, 299] o de forma indirecta sobre Rb^[34] y p53^[300-302] por medio de SIRT1^[303, 304].

4.5. AMPK en cáncer

AMPK es un importante modulador del metabolismo energético no sólo en células normales sino también en células tumorales^[305]. A nivel molecular AMPK se ha estudiado en oncogénesis y progresión tumoral principalmente por su papel en la regulación de la síntesis *de novo* de FA, así como también por ser regulado por LKB1. Existen evidencias que sitúan a LKB1 como un supresor de tumores, ya que su activación en líneas celulares induce parada en G₁, y mutaciones en LKB1 impiden que se detenga el ciclo celular^[306]. Asimismo mutaciones en el gen de LKB1 han sido encontradas en un gran número de tipos tumorales, llegando a encontrarse mutado en un 34% de los adenocarcinomas de pulmón^[307-309].

LKB1 fosforila y activa a AMPK y por diversas evidencias se ha propuesto a AMPK como su principal efector y por lo tanto como un supresor tumoral. Además, AMPK ha

sido identificado como una kinasa que activa a TSC2^[310] (supresor tumoral implicado en inhibir la ruta de mTOR). Recientemente también se ha demostrado que AMPK fosforila e inhibe a Raptor, otro modulador de mTOR^[311]. Todo esto impediría la síntesis de proteínas y la progresión del ciclo celular^[305].

AMPK también puede actuar como supresor tumoral por medio de la regulación del metabolismo lipídico inhibiendo enzimas esenciales para la síntesis de FA como son ACC y FASN^[305]. FASN ha sido considerado como un oncogén metabólico altamente expresado en distintos tipos de tumores tales como mama, próstata y glioma^[312, 313] y diversos estudios han mostrado que la inhibición de FASN por agentes farmacológicos o mediante el uso de siRNA disminuye la proliferación de células tumorales e inducen su apoptosis^[314, 315]. Finalmente y como ya hemos visto AMPK también regula la actividad de p53 resultando en la inhibición del crecimiento de células tumorales^[316].

Dadas estas circunstancias la inmensa mayoría de los trabajos realizados han sido orientados a la activación de AMPK como medio de inhibir el crecimiento tumoral.

Sin embargo trabajos recientes han observado elevados niveles de pAMPK en ciertos tipos tumorales entre ellos glioma^[317-319]. Estos resultados junto con el hallazgo del papel de AMPK como promotor de ciclo comienzan a plantear cuestiones a cerca de las implicaciones de este enzima tanto en tumorigénesis como en la progresión tumoral.

Objetivo

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la regulación del metabolismo de las células tumorales, concretamente en el metabolismo de lípidos, así como en la importancia de AMPK durante el proceso de oncogénesis, nos hemos propuesto un objetivo básico en este trabajo:

Estudiar el estado metabólico, su regulación y el papel de AMPK durante el proceso de transformación celular, utilizando para ello un modelo de glioma.

Material y métodos

1. Cultivos celulares

En este trabajo hemos utilizado cultivos primarios de astrositos de ratón y líneas celulares de glioblastoma humano. Tanto los cultivos primarios como las líneas celulares utilizadas (U87MG, U373MG y Phoenix) se mantuvieron en DMEN suplementado con un 10% de FBS.

Para realizar el cultivo primario de astrocitos neonatales, se utilizaron ratones de 3 días de edad de la cepa B6.129S4-*Pten*^{*tm1Hwu*}/J, o *AMPKα*^{*loxP/loxP*}. Los ratones *AMPKα*^{*loxP/loxP*} (cedidos por el Dr. B. Viollet, CNRS, París) fueron generados al cruzar *AMPKα1*^{*loxP/loxP*} (resultados no publicados de Viollet B y Fisher M) y *AMPKα2*^{*loxP/loxP*} [320]. Ambas cepas de ratones son totalmente viables. Los animales fueron alimentados *ad libitum* y

mantenidos en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. Para su manejo se siguió la normativa del comité bioético de nuestra institución.

Tras el sacrificio de los ratones, se diseccionaron los hemisferios cerebrales en condiciones estériles y se disgregaron mecánicamente en DMEN (Sigma Aldrich) suplementado con un 10% de FBS (Gibco). La suspensión celular se pasó a través de una malla de nylon estéril de 40 μm de diámetro de poro (BD, Falcon) y se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm y 25°C. El pellet se resuspendió en DMEN suplementado con un 10% de FBS y las células se sembraron en placas de 100 mm de diámetro a una densidad de 1×10^4 células/cm²[322].

Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5% durante 24 horas. Transcurrido este tiempo los restos celulares se eliminaron mediante un lavado con PBS estéril (Sigma Aldrich). A las células se les añadió medio de cultivo fresco (DMEN suplementado con un 10% de FBS) y se mantuvieron en cultivo durante 3-4 días.

Para los experimentos de deficiencia de lipoproteínas, las células fueron cultivadas en DMEN suplementado con un 10% de suero deficiente en lipoproteínas (Sigma), el cual contiene una concentración de lipoproteínas inferior al 5% (a partir de ahora denominado LPDM). Para la realización de los experimentos de suplemento de lipoproteínas, las células se cultivaron en LPDM junto con VLDL, LDL y HDL (Calbiochem), a las concentraciones indicadas.

Para la inhibición/activación de AMPK se utilizó compuesto C y AICAR (Calbiochem), respectivamente. Los compuestos fueron añadidos al medio de cultivo (DMEN, 10% FBS) a la concentración y el tiempo indicados.

Todos los experimentos fueron realizados en células mantenidas en cultivo siete días a menos que en el texto aparezca otra indicación.

2. Infección retroviral y transfección

Como consecuencia de la poca eficiencia en la transfección de los cultivos primarios, optamos por la infección como método para expresar *H-Ras*^{V12} y la recombinasa *Cre* de forma estable. La infección se realizó con virus ecotrópicos obtenidos mediante la

transfección de células empaquetadoras Phoenix con los vectores retrovirales PIG, PIG-CRE, pBABE y pBABE-H-Ras^{V12} (cedidos por P.P. Pandolfi).

Las células Phoenix ecotópicas^[323] se sembraron a una densidad de 5×10^4 células/cm² en placas de 100 mm de diámetro. Doce horas más tarde se les cambió el medio de cultivo por un medio fresco y se transfectaron con los vectores retrovirales mencionados utilizando el método del fosfato cálcico^[324]. Cada vector fue transfectado por separado en una placa de Phoenix a una concentración de 1,5 µg/mL. La eficacia de la transfección se cuantificó mediante la visualización de GFP, expresado en las células infectadas con el vector PIG o PIG-CRE, usando para ello un microscopio de fluorescencia Olympus (IX 70).

A las 48 horas de la transfección se recogió el medio de cultivo que contenía los retrovirus, y se filtró utilizando filtros de acetato de celulosa estériles de 0,45 µm de poro Minisart, a fin de poder así eliminar las posibles células presentes en el sobrenadante.

Los cultivos primarios de astrocitos, obtenidos de ambas cepas de ratón, se sembraron en placas de 100 mm de diámetro a una densidad de 4250 células/cm². Tras 24 horas en cultivo se realizó una doble infección en presencia de polibreno 4 mM (Sigma Aldrich), estableciéndose cuatro grupos experimentales:

En el caso de células *Pten*^{loxP/loxP}

<i>Pten</i> ^{loxP/loxP} :	infectado con PIG + pBABE
<i>Pten</i> ^{loxP/loxP} <i>H-Ras</i> ^{V12} :	infectado con PIG + pBABE-H-Ras ^{V12}
<i>Pten</i> ^{-/-} :	infectado con PIG-CRE + pBABE
<i>Pten</i> ^{-/-} <i>H-Ras</i> ^{V12} :	infectado con PIG-CRE + pBABE-H-Ras ^{V12}

En el caso de células *AMPK*^{loxP/loxP}

<i>AMPK</i> ^{loxP/loxP} :	infectado con PIG + pBABE
<i>AMPK</i> ^{loxP/loxP} <i>H-Ras</i> ^{V12} :	infectado con PIG + pBABE-H-Ras ^{V12}
<i>AMPK</i> ^{-/-} :	infectado con PIG-CRE + pBABE
<i>AMPK</i> ^{-/-} <i>H-Ras</i> ^{V12} :	infectado con PIG-CRE + pBABE-H-Ras ^{V12}

A las 24 horas tras la infección los astrocitos se seleccionaron con puromicina 2 µg/mL (Sigma Aldrich) para eliminar las células no infectadas. La selección se mantuvo durante 3 días y transcurrido este tiempo los astrocitos se subcultivaron para realizar los

distintos experimentos en placas de 100 mm de diámetro o placas de 24 pocillos a una densidad de 4250 células/cm².

Para el silenciamiento de AMPK en las líneas celulares U87MG y U373MG utilizamos siRNA comerciales contra las subunidades catalíticas de AMPK (SantaCruz). Las células se sembraron a una densidad de 15x10³ células/cm² en placas de 6 pocillos. Tras 24 horas de cultivo las células fueron transfectadas con los siRNA indicados a una concentración 10-20nM usando para ello el medio de transfección jetPRIME (Polyplus) según indicaciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas tras la transfección las células se utilizaron para los experimentos indicados.

3. Bloqueo de receptores de lipoproteínas

Para la determinación de la funcionalidad de los receptores de lipoproteínas así como del efecto de su bloqueo mediante distintos péptidos utilizamos lipoproteínas marcadas con un fluorocromo (DiI). Concretamente empleamos VLDL-DiI y LDL-DiI (Kalen Biomedical). Para el bloqueo de receptores de lipoproteínas utilizamos TFPIc23 (New england peptide) y Rap (LOXO). En estos experimentos cada grupo experimental se sembró por triplicado en placas de 24 pocillos a una densidad de 4250 células/cm² en 300µL de LPDM, 300µL de LPDM conteniendo TFPIc23 5-10-20µM o 300µL de LPDM conteniendo Rap 1-2-4µM. Tras una incubación de 30 minutos se añadieron 10µg de VLDL-DiI o LDL-DiI por pocillo. Después de una hora las células se lavaron con PBS para eliminar los restos de lipoproteínas marcadas y se fijaron en PFA 2%. Posteriormente, los núcleos se contratiñeron con Hoechst-33258 y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Olympus (IX 70). Asimismo se tomaron microfotografías de campos aleatorios y se cuantificó la cantidad de fluorescencia por célula usando para ello el software ImageJ del NIH. Para el estudio del efecto de TFPIc23 o Rap sobre proliferación, las células se sembraron en DMEN 10% FBS, en DMEN 10% FBS conteniendo TFPIc23 5-10-20µM o DMEN 10% FBS conteniendo Rap 1-2-4µM y se realizaron curvas de crecimiento usando el método de cristal violeta.

4. Curvas de proliferación e incorporación de BrdU

Para elaborar las curvas de proliferación el número de células fue determinado de forma indirecta mediante la técnica de cristal violeta^[325].

Cada grupo experimental se sembró por triplicado en placas de 24 pocillos a una densidad de 4250 células/cm². En los días 1, 3, 5 y 7 las células se fijaron con metanol/acético 3/1 durante 15 minutos, se lavaron con PBS, y se tiñeron durante 30 minutos con cristal violeta al 0,1% en PBS w/v (todo ello de Sigma Aldrich). El exceso de tinción fue eliminado mediante lavados con PBS.

El cristal violeta captado por las células se extrajo utilizando ácido acético al 10% v/v durante 1 hora en agitación. Se determinó la absorbancia de cada muestra (595nm) por triplicado para lo que se utilizó un lector de microplacas Tecan Sunrise. Los datos se representaron en unidades de absorbancia.

Para la determinación de la incorporación de BrdU, las células fueron cultivadas en cubreobjetos circulares de 1,13cm², se incubaron con 5-bromo 2-deoxiuridina (Sigma Aldrich) 5mM durante 1 hora y se fijaron con etanol al 80%.

Para permeabilizar las células y desnaturalizar el DNA se utilizó un tratamiento con HCl 4N durante 20 minutos. Posteriormente las células se bloquearon durante 15 minutos con BSA al 0,5% en PBS w/v y Tween 20 al 0,5% v/v (Sigma Aldrich). Transcurrido este tiempo se incubaron durante 12 horas a 4°C con el anticuerpo primario anti-BrdU 1/100 (Sigma Aldrich). Tras varios lavados con PBS (Sigma), las células se incubaron en oscuridad durante 45 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG F(ab')₂ conjugado con el fluorocromo CY3 (Jackson Immunoresearch) y Hoechst-33258 10uM (Sigma Aldrich).

Las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX 70) y se fotografiaron campos aleatorios para posteriormente proceder a la cuantificación del número total de células (Hoechst-33258) y el número de células en fase S (BrdU).

5. Apoptosis y senescencia

La apoptosis fue determinada mediante tinción nuclear con Hoechst-33258 (Sigma Aldrich). El Hoechst es un colorante vital con una elevada afinidad por el DNA en concreto por los pares de bases A-T, lo que permite visualizar la condensación de cromatina. De esta forma podemos apreciar los cambios que ocurren en las células apoptóticas y así cuantificarlas. Para ello las células se sembraron en placas de 24 pocillos, cada grupo por triplicado. Tras los tratamientos y tiempos indicados en cada experimento se fijaron con metanol/acético (3/1), se lavaron con PBS, y se incubaron en Hoechst-33258 2 μ M durante 30 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo las células se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus IX 70) se tomaron fotos de tres campos aleatorios de cada replicado, y se cuantificó el número de células apoptóticas por campo mediante la observación de núcleos con condensación de cromatina localizada en la membrana nuclear, y cromatina condensada en núcleos fragmentados. El porcentaje de células apoptóticas se representó en relación al número total de células.

El ensayo de senescencia esta basado en la presencia de actividad β -Galactosidasa a pH ácido en las células senescentes^[326]. Para conocer el número de células senescentes, se utilizó el kit de senescencia de Cell-Signalling. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos, cada grupo por triplicado, y transcurridos 7 días se fijaron e incubaron con las soluciones contenidas en el kit según indicaciones del fabricante. Para conocer el número total de células se utilizó la tinción nuclear con Hoechst-33258. Las células se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus IX 70) y se fotografiaron campos aleatorios para posteriormente cuantificar el porcentaje de células senescentes.

6. Ensayo de tumorigénesis en ratones SCID

Los ratones SCID fueron alimentados *ad libitum* y mantenidos en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. Para estimar el efecto antitumoral del compuesto *C in vivo*, se inyectaron 2,5x10⁶ de células de la línea U87MG en el flanco derecho de ratones SCID de 6-8 semanas de edad (20–25g). Cuando los tumores subcutáneos alcanzaron un tamaño mínimo de 10 mm³, fueron medidos diariamente hasta el final del experimento

usando para ello un calibre. El volumen del tumor fue calculado según la fórmula: $((\text{longitud}^2 \times \text{ancho})/2)$. Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de 10 mm³ los ratones fueron separados en dos grupos para iniciar el tratamiento. Un grupo fue tratado con compuesto C, administrado como una única dosis de 10 mg/kg intraperitonealmente, mientras que el segundo grupo recibió una inyección del vehículo (100µL PBS/DMSO 10%). El estado de salud de los ratones fue monitorizado diariamente y cuando los tumores alcanzaron una longitud superior a los 200 mm³, los animales fueron sacrificados y este dato se utilizó para calcular el porcentaje de supervivencia.

7. Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos circulares de 1,13 cm² y tras 7 días en cultivo se fijaron con etanol al 80%. Para permeabilizar las células se utilizó un tratamiento con triton X-100 0,1% en PBS v/v durante 5 minutos. Posteriormente las células se bloquearon durante 15 minutos con PBS-BSA 0,5% w/v (Sigma Aldrich), y transcurrido este tiempo se incubaron durante 12 horas a 4°C con los anticuerpos primarios pAMPK^{Thr172} 1/100 o pRb^{Ser807/811} 1/200 (Cell Signaling). Tras varios lavados con PBS (Sigma), las células se incubaron en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG conjugado con el fluorocromo CY3 (Jackson ImmunoResearch) y Hoechst-33258 10µM (Sigma Aldrich). Las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX 70) y se fotografiaron campos aleatorios.

Para la realización de la inmunohistoquímica de los tumores, los animales fueron tratados como se indica en el texto, y 1 hora antes del sacrificio se inyectó i.p. 100µg/g de BrdU. Los tumores fueron diseccionados y fijados en formalina tamponada al 0,5%. Los tejidos se deshidrataron e incluyeron en parafina. Cortes de 5µm se desparafinaron e hidrataron. La recuperación antigénica para pHistona H3 y Caspasa-3 activa fue buffer citrato pH6 y para BrdU Tris-EDTA pH9. La actividad peroxidasa fue inhibida con peróxido de hidrógeno al 3% y se incubó toda la noche a 4°C con los anticuerpos anti-BrdU (Sigma), anti-pHistona H3 o anti-Caspasa-3 activa (Cell Signaling) a una concentración de 1/2000, 1/100 y 1/200, respectivamente. El anticuerpo secundario

(Dako) fue incubado durante 30 minutos, y revelado con DAB (Dako), para luego ser teñido con hematoxilina, deshidratado y montado. Los cortes fueron observados bajo microscopio y se tomaron microfotografías sobre las cuales se contaron el número de células positivas para los anticuerpos usados.

8. Extracción de proteína y fraccionamiento celular

Tras los tiempos y/o tratamientos indicados en cada experimento, las células se lavaron con PBS, y se obtuvo el extracto proteico total lisando las células con un *scraper* y un tampón de lisis compuesto por: Tris-HCl 50mM (pH7,5), NaCl 150mM, EGTA 1mM, EDTA 1mM, Triton-X 100 1% w/w, pirofosfato de sodio 5mM, sacarosa 0,27M, Na₃VO₄ 1mM, NaF 50mM (todo de Sigma Aldrich), y el cóctel inhibidor de proteasas Complete EDTA-Free a la concentración indicada por el proveedor (Roche).

El lisado celular se mantuvo a 4°C durante 30 minutos, tras lo cual se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se descartó el pellet.

La concentración de proteína de las muestras se cuantificó mediante el método de Bradford^[327] usando para ello el reactivo Protein Assay (BioRad). Como patrón se usaron diluciones crecientes de BSA (Sigma Aldrich) y se cuantificó la absorbancia A595nm en un espectofotómetro.

Para el fraccionamiento celular, las células se mantuvieron 7 días en cultivo tras los cuales se tripsinizaron y lavaron con PBS. Las células se recuperaron por centrifugación (900rpm, 5 minutos, 4°C) y se resuspendieron en 3 volúmenes de tampón de lisis (Hepes, pH 7,9 20mM, NaCl 10mM, MgCl₂ 1mM, Sucrose 0,5M, EDTA (pH8) 0,2mM, Triton X-100 0,35% v/v). El sobrenadante obtenido tras una centrifugación a 800g, 10 minutos, a 4°C, fue conservado a -80°C y el precipitado se lavó con PBS para eliminar los restos de proteínas citoplasmáticas, para luego ser resuspendido en un tampón conteniendo Tris pH 7,4 10mM, KCl 10mM, MgCl₂ 2mM. Esta solución se depositó sobre una solución de sacarosa al 30% y se centrifugó a 16100g a 4°C durante 10 minutos. El precipitado conteniendo los núcleos fue lisado en el tampón de lisis utilizado previamente mediante la realización de tres choques térmicos por congelación en nitrógeno líquido y descongelación en baño a 20°C. El DNA fue fragmentado con

DNase (Sigma), la muestra fue centrifugada 16100g 4°C 15 minutos y el sobrenadante conteniendo el extracto nuclear fue congelado a -80°C hasta su utilización.

9. PCR y RT-PCR

La determinación de la correcta delección de *Pten* a nivel de DNA se realizó mediante amplificación por PCR de este gen.

Para la extracción de DNA genómico las células se incubaron durante 1 hora a 55°C con un tampón de extracción compuesto por NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM (pH 7,5), EDTA 1mM, SDS 1% (Panreac), y Proteinasa K 20mg/ml (Sigma Aldrich). El DNA se purificó con fenol:cloroformo:alcohol isoamilico 25:24:1, y se precipitó con isopropanol a -20°C durante 5 minutos.

Para la amplificación del DNA se usaron los siguientes oligonucleotidos (*forward* P1, 5'-ACTCAAGGCAGGGATGAGC-3' *reverse* P2 5'-AATCTAGGGCCTCTTGTGCC-3' *reverse* P3 5'GCTTGATATCGAATTCCTGC AGC-3') ya descritos con anterioridad⁽³²¹⁾, y una mezcla de reacción compuesta por:

- Buffer de PCR 10x (Tris HCl 200 mM (pH 8.4), KCl 500 mM
- MgCl₂ 1,5mM
- dNTP 0,2mM
- Primers 0,05mM de cada uno
- Taq DNA polimerasa 1,25U

Todos los reactivos fueron adquiridos de Invitrogen.

La concentración de DNA se determinó mediante absorbancia A_{260/280nm} en un espectrofotómetro, y la amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 de MJ Research, siguiendo las condiciones especificadas en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de la PCR

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	3 min
2	94 °C	1 min
3	60 °C	1 min
4	72 °C	2 min
5	34 ciclos	
6	72 °C	10 min

Para la determinación de la expresión de los receptores de lipoproteínas, se analizaron los niveles de mRNA de estos. El RNA fue extraído de las células mediante la utilización de TRizol (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. El RNA obtenido fue calentado a 65°C durante 5 minutos e inmediatamente enfriado a 4°C para eliminar las posibles estructuras secundarias presentes en el RNA. Una vez cuantificado el RNA mediante espectrofotometría se procedió a la realización de la RT, para lo cual 1 µg de RNA fue añadido a la mezcla de reacción conteniendo:

- Buffer 5x (Tris HCl 250 mM (pH 8.3), KCl 375 mM, MgCl₂ 1,5mM)
- dNTP 0,2mM
- Randon primers 200ng
- RNasaout 20U
- M-MLV RT 400U

Todo ello fue realizado con material y agua libre de RNasas. La primera cadena de cDNA fue sintetizada según indicaciones del proveedor de M-MLV (Invitrogen). Para la PCR, 5 µL del producto de RT se añadieron a la mezcla de PCR (mostrada previamente). La amplificación específica de la secuencia de los receptores de lipoproteínas se realizó mediante la utilización de primers específicos (Tabla 2).

Los productos de PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 2% (Promadisa) y bromuro de etidio 5mM (Sigma Aldrich), para luego ser visualizadas con un sistema digital de análisis de imagen Geldoc 1000 (Bio Rad).

Tabla 2. Primers			
Diana	Nº ciclos	Tº amplificación	Secuencia primers
VLDLr	26	72 °C	5'-CGCCACTGCAAGCGGGAAGA-3' 5'-GTCGCGCCATCCGCACAGT-3'
LDLr	28	72 °C	5'-GACGAGCTCGGCTGCGTCAA-3' 5'-CGACCAGTCCTGGCAGTCGC-3'
ABCG1	26	72 °C	5'-GGCCATTGCCCTGGAGCTGG-3' 5'-CAGACGATGGAGCGGCCACC-3'
LRP5	30	72 °C	5'-TGCCAACCTGGACGGCTCCT-3' 5'-TTGCAGGCGTGGATGGAGCG-3'
Scarb1	28	72 °C	5'-GTCCGGGAGCGTGGACCCTA-3' 5'-GGAGGCTGCGGTTCTCCACG-3'
Scarb2	28	72 °C	5'-TCAAACCTGACGTCTCCCCGA-3' 5'-GGTCCACCAGTCCAGCGACG-3'
HPRT	24	72 °C	5'-CAGTCCCAGCGTCGTGATTA-3' 5'-AGCAAGTCTTTCAGTCCTGTC-3'

10. Western blot

La determinación de los niveles de las proteínas de interés se realizó mediante Western Blot.

La electroforesis se realizó en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) del 8-10% y se corrieron 30µg de proteína por pocillo. Posteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman), se bloquearon durante 1 hora con las soluciones indicadas en cada caso y se incubaron con los anticuerpos que aparecen detallados en la Tabla 3.

Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa fueron Anti-mouse IgG, Anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences) y Anti-goat IgG (Santacruz) a una concentración 1:5000 en leche al 5% en TBST, w/v, durante una hora a temperatura ambiente. Tras los lavados, la actividad peroxidasa se detectó con el sistema de quimioluminiscencia ECL (Pierce) seguido de la exposición y revelado de una película fotográfica.

Tabla 3. Características y condiciones de los anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Condiciones de incubación	Origen
α -Tubulina	Sigma Aldrich	T5168	TBST, Leche 5% w/v, 1 horas (Ac 1:10000)	ratón
ABCG1	Novus biologicals	NB400-132	TBST, Leche 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
ACC	Cell Signaling	3676	TBST, BSA 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
AKT	Cell Signaling	4685	TBST, Leche 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
AMPK α	Cell Signaling	2603	TBST, Leche 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
AMPK β_1	Cell Signaling	4178	TBST, Leche 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
AMPK $\beta_{1/2}$	Cell Signaling	4150	TBST, Leche 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
FASN	BD	610963	TBST, Leche 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	ratón
H-Ras Total	Oncogene	OP40	TBST, Leche 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	ratón
Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Condiciones de incubación	Origen
H-RAS ^{V12}	Calbiochem	OP38	TBST, Leche 5% w/v, 12 horas (Ac 1:500)	ratón
Lamina B	Santa Cruz	sc-6216	TBST, Leche 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	cabra
LDLr	abcam	ab30532	TBST, Leche 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
p4E-BP1 ^{Thr37/46}	Cell Signaling	9459	TBST, BSA 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo

Tabla 3. Continuación

p70S6 Kinase ^{Ser371}	Cell Signaling	9208	TBST, BSA 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
pACC ^{Ser79}	Cell Signaling	3661	TBST, BSA 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
pAKT ^{Ser473}	Cell Signaling	4051	TBST, BSA 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	ratón
pAMPK ^{Thr178}	Cell Signaling	2535	TBST, BSA 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
pERK1/2 ^{Thr202/Tyr204}	Cell Signaling	4370	TBST, BSA 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	ratón
pmTOR ^{Ser2448}	Cell Signaling	2971	TBST, BSA 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
pRb ^{Ser807/811}	Cell Signaling	9308	TBST, BSA 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
pS6 ^{Ser235/236}	Cell Signaling	2211	TBST, BSA 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
PTEN	NeoMarkers	RB-072-P	TBST, Leche 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
pTSC2 ^{Ser939}	Cell Signaling	3615	TBST, BSA 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	conejo
Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Condiciones de incubación	Origen
SREBP1	Santa Cruz	sc-8984	TBST, Leche 5% w/v, 12 horas (Ac 1:500)	conejo
VLDLr	RD Systems	AF2258	TBST, Leche 5% w/v, 12 horas (Ac 1:1000)	cabra

11. Actividad de FASN

La actividad de FASN se cuantificó mediante el método espectrofotométrico, determinada como disminución de la absorbancia a 340nm por oxidación del NADPH^[328].

Una vez recogida y cuantificada la proteína de los distintos grupos experimentales, se conservó a -80°C durante un periodo máximo de 4 días. Los extractos proteicos fueron descongelados a 4°C para impedir la degradación proteica, y se procedió a la realización del experimento. Se añadieron 300µg de proteína a la siguiente mezcla de reacción: Tampón fosfato 200mM (pH 7), EDTA 1mM, DTT 1mM, Acetil-CoA 30µM, y NADPH 0,24mM. Esta mezcla se mantuvo 5 minutos a 37°C, y por último se le añadió Malonil-CoA 50µM, en un volumen final de 300µL (todos los reactivos utilizados se adquirieron en Sigma Aldrich). La absorbancia de las muestras se midió por triplicado durante 20 minutos a intervalos de 4 segundos y a una temperatura de 37°C. En los blancos se sustituyó el Malonil-CoA por tampón fosfato.

Se corrigió la disminución en la absorbancia a 340nm de cada muestra por su blanco y se tomó la pendiente de las rectas como medida de actividad.

12. Actividad ACC-FASN

Para la actividad ACC-FASN^[329] 300µg de proteína se incubaron en una mezcla de reacción conteniendo Tris-HCl 50mM (pH7.5), citrato potásico 20mM, NaHCO₃ 10mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM, EDTA 1mM, ATP 3mM, BSA al 0,03% y NADPH 0,24mM. El inicio de la reacción se produjo por la adición de acetil-CoA conteniendo [1-¹⁴C] acetil-CoA 0,1µCi a una concentración final de 30µM. La reacción se mantuvo durante 60 minutos a 37°C. Los FA fueron extraídos mediante una modificación del protocolo de Bligh Dyer^[330]. Finalmente los FA marcados fueron cuantificados mediante la utilización de un contador β.

13. Síntesis de lípidos

El nivel de síntesis de lípidos fue determinado como incorporación de ^{14}C en los lípidos celulares partiendo de glucosa marcada. Para ello las células fueron sembradas por triplicado en placas de 12 pocillos a una densidad de 4250 células/cm². Tras siete días en cultivo se añadió D-[6- ^{14}C] Glucosa a una concentración de 2 $\mu\text{Ci/ml}$ y las células se mantuvieron durante 5 horas en presencia del metabolito marcado. Los restos de glucosa marcada fueron eliminados mediante la realización de un lavado con PBS y los lípidos celulares se extrajeron mediante una modificación del protocolo de Bligh Dyer^[330]. Los lípidos marcados se cuantificaron en un contador β .

14. Análisis estadístico de los resultados

Todos los experimentos fueron repetidos un mínimo tres veces y para cada grupo de datos se calcularon la media \pm SEM. La normalidad de los datos se comprobó mediante el test Kolmogorov-Smirnov de normalidad. Los datos fueron analizados mediante *t*-test, o Anova de uno o dos factores según se indica en cada experimento. La supervivencia fue estimada por curvas de Kaplan-Meier.

Resultados

1. Delección de *Pten* y expresión de Ras oncogénico en astrocitos de ratón como modelo experimental de tumores gliales

Las vías de PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK juegan un papel importante en la regulación del metabolismo celular y ambas rutas aparecen frecuentemente sobreactivadas en tumores humanos^[70]. Puesto que los gliomas presentan con frecuencia mutaciones que activan estas vías decidimos utilizarlo como modelo tumoral para estudiar el papel de estas cascadas intracelulares en las adaptaciones metabólicas de células tumorales. Ya se ha demostrado previamente que la activación de la ruta PI3K/Akt por la delección de *Pten*, junto con la activación de Raf/MEK/ERK por la expresión de EGFRvIII desencadena la transformación de células gliales murinas^[331]. Basándonos en todos estos datos y para

modelizar los gliomas *in vitro* utilizamos en primer lugar cultivos primarios de astrocitos neonatales de ratón en los que activamos la ruta de PI3K/Akt y/o Raf/MEK/ERK. De esta forma hemos podido estudiar de forma aislada y conjunta ambos eventos oncogénicos y su efecto sobre el estado metabólico y proliferativo de la célula.

1.1. Caracterización de la delección de *Pten* y expresión de Ras oncogénico

Para la obtención del modelo realizamos cultivos primarios de astrocitos neonatales de ratón en los que se activó la ruta de PI3K/Akt y/o Raf/MEK/ERK mediante la delección de *Pten* y/o expresión de Ras oncogénico respectivamente. Tras la infección retroviral obtuvimos los cuatro grupos experimentales (*Pten*^{loxP/loxP}, *Pten*^{loxP/loxP}H-Ras^{V12}, *Pten*^{-/-} y *Pten*^{-/-}H-Ras^{V12}). La eficiencia de infección fue determinada en primer lugar mediante la visualización del gen *reporter* GFP, obteniendo una infección superior al 90% en todos los grupos experimentales (Figura 1A). Las células infectadas con H-Ras^{V12} presentaron una morfología multiestrellada característica, niveles elevados de H-Ras^{V12} y activación de la ruta de MAPK determinada como aumento de los niveles de pERK (Figuras 1B y C). La delección de *Pten* fue comprobada tanto a nivel proteico como a nivel génico (Figura 1D y 1E), y las células con la delección de *Pten* presentaron un aumento de los niveles de pAkt (Figura 1D).

Con la expresión de Ras oncogénico en astrocitos neonatales hemos observado un incremento de la proliferación tanto en presencia como en ausencia de *Pten*. Con la delección de *Pten* no se observaron cambios en senescencia y apoptosis, y aunque pudimos apreciar un pequeño cambio en proliferación, éste no fue estadísticamente significativo. Asimismo, la expresión de H-Ras^{V12} no indujo cambios en senescencia o apoptosis, tal y como previamente se ha descrito^[332].

Los astrocitos que expresaban H-Ras^{V12} y delección de *Pten* también presentaron una gran dependencia de glucosa, tal y como ha sido ampliamente descrito en células transformadas y en modelos celulares con activación de las rutas estudiadas en este trabajo^[149-151, 153-159]. Hemos observado una disminución drástica de la tasa proliferativa de estas células en medios sin glucosa, un aumento de los niveles de transportadores de

glucosa (glut-1 o glut-3) en estas células, y una hiperpolarización de la membrana mitocondrial (datos no mostrados). Estos datos recapitulan el fenotipo glucolítico observado en tumores humanos y coinciden con los resultados mostrados por otros autores.

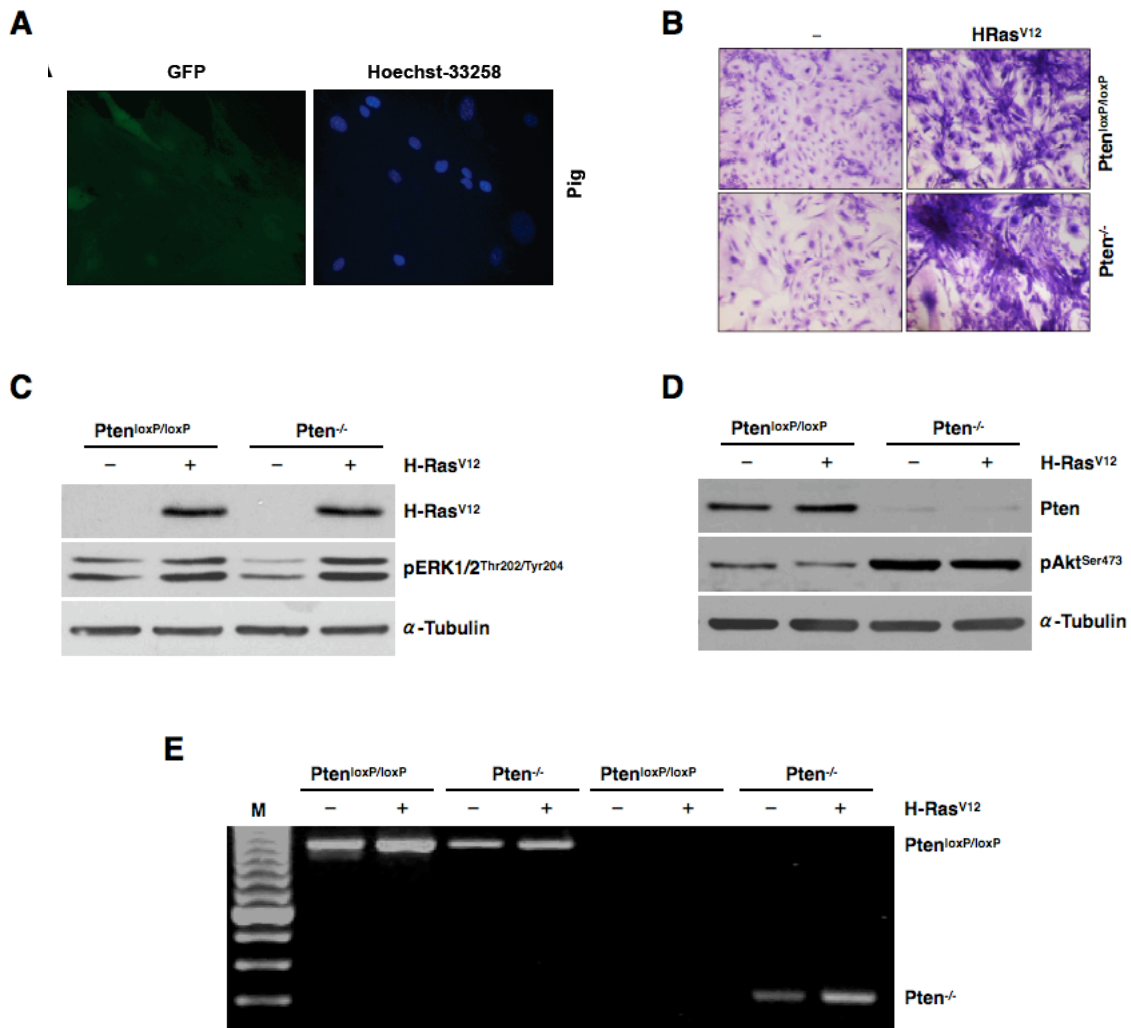


Figura 1: Caracterización del modelo celular. **A.** Microfotografías de astrocitos en cultivo mostrando el gen *reporter* GFP y tinción nuclear con Hoechst 33258. **B.** Microfotografías de astrocitos teñidos con cristal violeta. **C.** Niveles proteicos de H-Ras^{V12}, pERK1/2 y α-Tubulina. **D.** Niveles proteicos de PTEN, pAkt y α-Tubulina. **E.** Amplificación mediante PCR del exón 5 del gen *Pten*.

1.2. Metabolismo de lípidos extracelulares en presencia de Ras oncogénico y ausencia de *Pten*

Trabajos previos han demostrado, en un gran número de tipos tumorales incluyendo los glioblastomas, una síntesis *de novo* de FA incrementada involucrándose a la vía de PI3K/Akt en este efecto^[160, 229]. Sin embargo no se han llevado a cabo estudios que determinen el papel que los lípidos extracelulares desempeñan en células tumorales. Dado el gran consumo energético necesario para sintetizar FA y teniendo presente que las células tumorales necesitan un mayor aporte de éstos, decidimos realizar experimentos para determinar el papel de los lípidos extracelulares durante el proceso oncogénico.

1.2.1 Las lipoproteínas son la mayor fuente de lípidos para astrocitos que expresan Ras oncogénico y/o delecionan *Pten*

Con el fin de conocer si la expresión de H-Ras^{V12} y/o la deleción de *Pten* pone en marcha la síntesis *de novo* de FA e independiza a las células de los lípidos extracelulares, mantuvimos las células en un medio de cultivo deficiente en lipoproteínas (LPDM, <5% de lipoproteínas) durante siete días. La ausencia de lipoproteínas redujo el número de células en los grupos experimentales que expresaban Ras oncogénico y delecionaban *Pten* (*Pten*^{loxP/loxP}H-Ras^{V12}, *Pten*^{-/-} y *Pten*^{-/-}H-Ras^{V12}), aunque la reducción en proliferación mostrada por el grupo *Pten*^{-/-} no llegó a ser significativa. (Figura 1A y 1B).

Para evaluar el papel de las diferentes lipoproteínas sobre el crecimiento de los astrocitos incubamos las células en LPDM con VLDL, LDL o HDL, por separado o en todas las posibles combinaciones. En presencia de únicamente las lipoproteínas individuales no observamos cambios significativos en el nivel de crecimiento celular con respecto a células mantenidas en LPDM (Figura 3A).

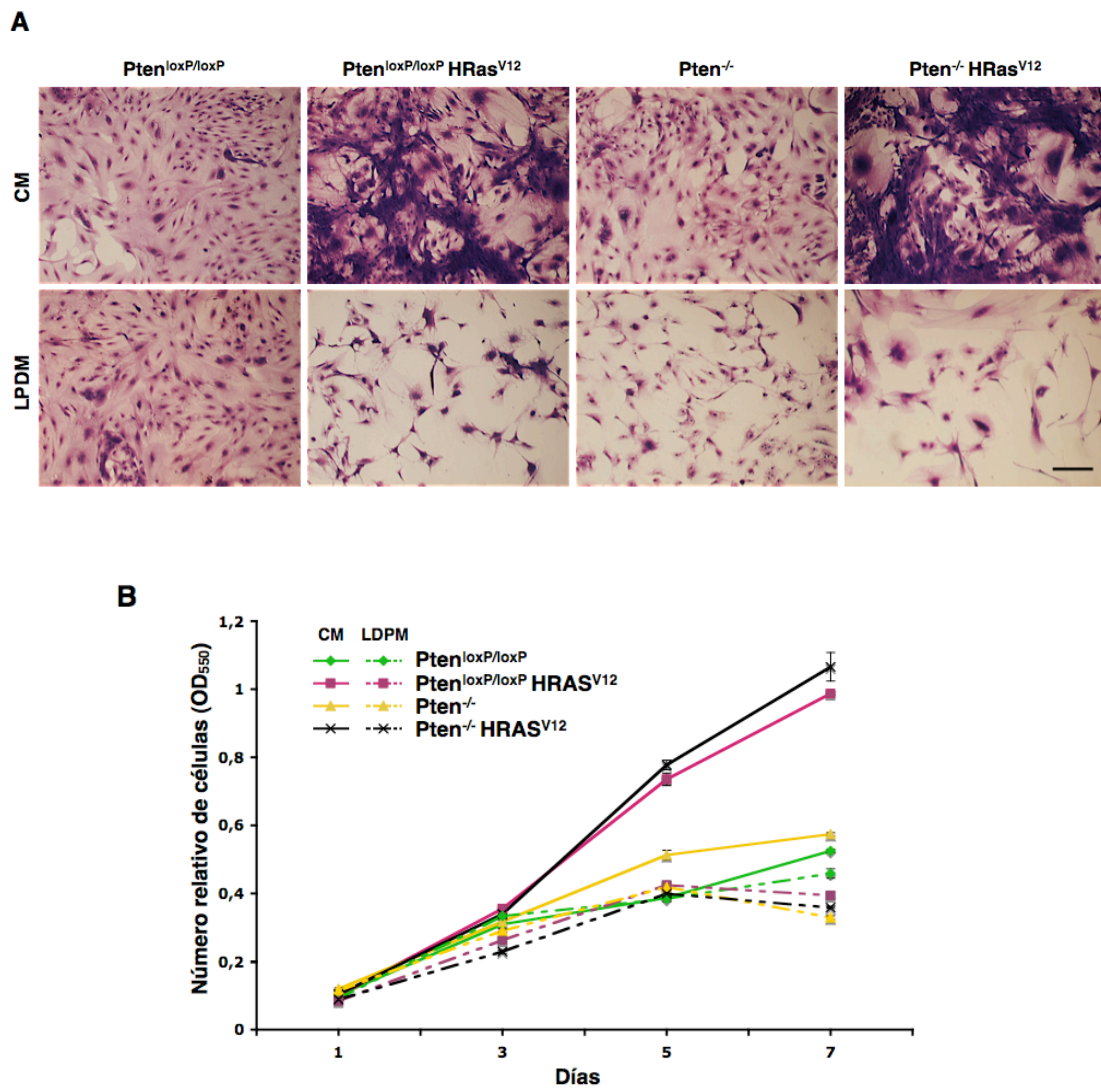


Figura 2: Dependencia de lipoproteínas. **A.** Microfotografías de las células de los cuatro grupos experimentales mantenidos durante 7 días en CM o LPDM. La barra representa 100 μ m. **B.** Curva de crecimiento celular en presencia de CM o LPDM. Los datos han sido representados como media \pm EEM.

Finalmente la incubación de los astrocitos con combinaciones de lipoproteínas mostraron que la presencia de HDL es necesaria en combinación con cualquiera de las otras lipoproteínas para inducir la recuperación de la capacidad proliferativa de las células que expresan Ras oncogénico (Figura 3D).

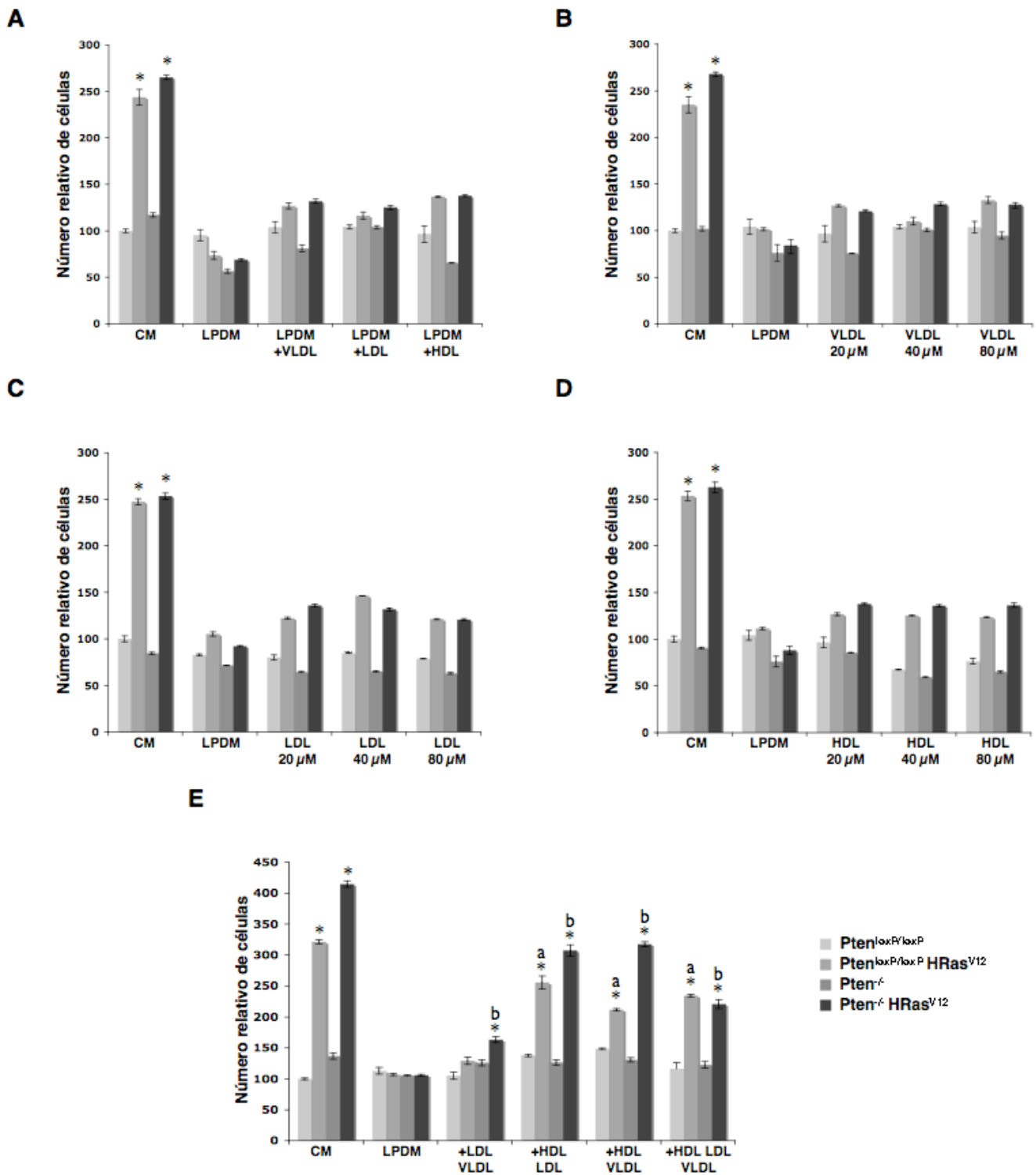


Figura 3: Rescate del crecimiento celular. A. Número relativo de células tras 7 días de cultivo en medio de cultivo completo (CM), deficiente en lipoproteínas (LPDM), o LPDM suplementado con VLDL, LDL o HDL. B. Efecto de concentraciones crecientes de VLDL, LDL (C) o HDL (D) sobre el crecimiento celular tras 7 días de cultivo. E. Número relativo de células mantenidas 7 días en presencia de la combinación de las lipoproteínas indicadas. Los datos se representan como media \pm EEM, y fueron analizados con ANOVA two way, tomando como factores el genotipo y el medio de cultivo (interacción $p < 0.0001$). Para las comparaciones entre grupos se utilizó el Bonferroni test (* $p < 0.005$ contra $Pten^{loxP/loxP}$ en CM, a $p < 0.005$ contra $Pten^{loxP/loxP}$ H-Ras^{V12} en LPDM y b $p < 0.005$ contra $Pten^{-/-}$ H-Ras^{V12} en LPDM).

1.2.2. La actividad de VLDLr y LDLr es necesaria para mantener la viabilidad de células que expresan Ras oncogénico y/o deletionan *Pten*

La gran mayoría de lípidos extracelulares aparecen unidos a lipoproteínas, y las células necesitan receptores específicos para su utilización. Aunque trabajos previos han demostrado que algunos tipos tumorales presentan una incrementada expresión de diversos tipos de receptores de lipoproteínas, no se han realizado estudios para determinar su papel en la biología tumoral^[333-335]. Nosotros estudiamos los niveles de los principales receptores de lipoproteínas en los cuatro grupos experimentales. Tal y como puede observarse en las Figuras 4A y 4B los niveles de VLDLr, LDLr y ABCG1 aparecen aumentados tanto a nivel de RNA como de proteína fundamentalmente en células que expresan H-Ras^{V12}. No hemos detectado cambios significativos en la expresión de otros receptores estudiados como Scarb1, Scarb2 o Lrp5 (Figura 4C).

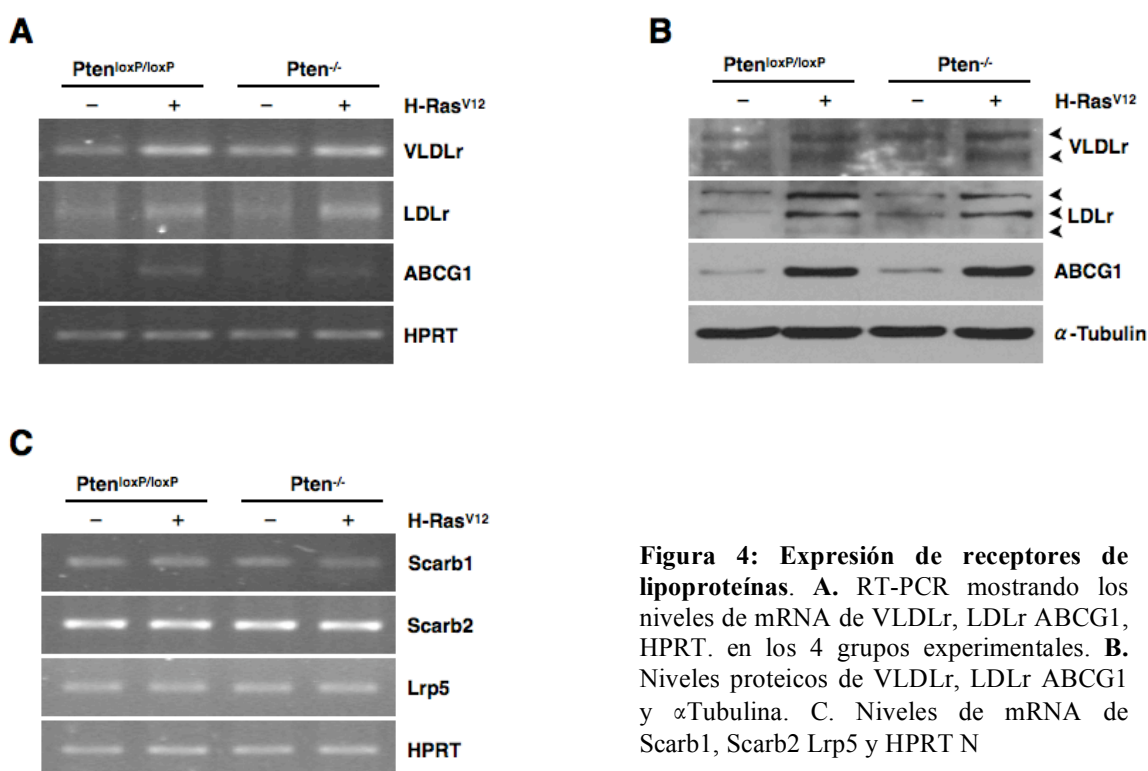
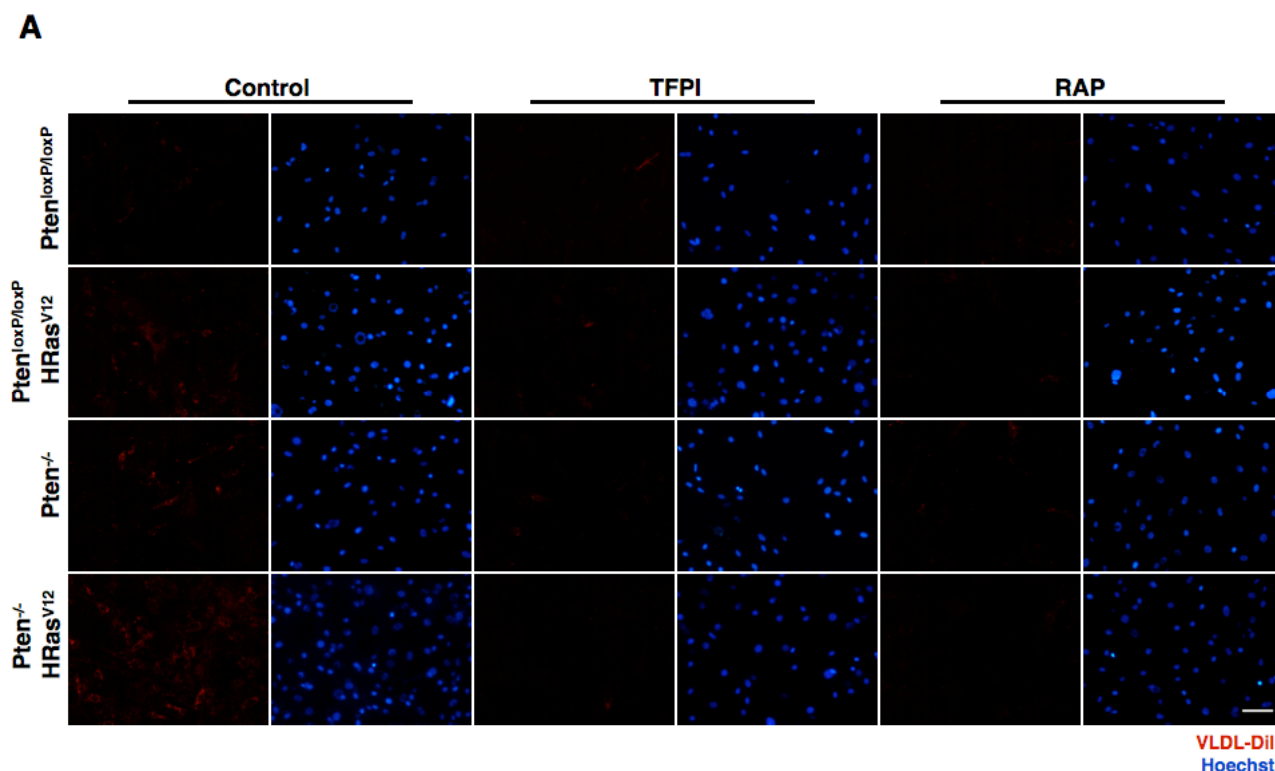


Figura 4: Expresión de receptores de lipoproteínas. A. RT-PCR mostrando los niveles de mRNA de VLDLr, LDLr ABCG1, HPRT. en los 4 grupos experimentales. B. Niveles proteicos de VLDLr, LDLr ABCG1 y α Tubulina. C. Niveles de mRNA de Scarb1, Scarb2 Lrp5 y HPRT N

Para demostrar el papel de la entrada de lípidos a través de VLDLr y LDLr sobre el crecimiento celular en nuestro modelo bloqueamos estos receptores dos polipéptidos: TFPIc23, que bloquea VLDLr específicamente y RAP, que bloquea VLDLr, LDLr y otros receptores de la familia LRP^[336, 337]. Para determinar la capacidad de impedir la interacción entre VLDL y LDL a sus receptores por TFPIc23 y RAP utilizamos lipoproteínas marcadas con un fluorocromo (VLDL-Dil y LDL-Dil). Como se observa en la Figura 5 los grupos experimentales que expresaban Ras oncogénico presentaron un mayor marcaje con VLDL-Dil y LDL-Dil lo que se relaciona con el mayor nivel de expresión de VLDLr y LDLr de estas células (Figura 4B). El tratamiento con TFPIc23 a una concentración de 5 μ M y de RAP 1 μ M redujeron significativamente la incorporación de VLDL en todos los grupos experimentales (Figura 5A y C). El tratamiento con RAP disminuyó significativamente tanto la incorporación de VLDL como la de LDL (Figura 5C y D). Sin embargo el tratamiento con TFPIc23 no afectó los niveles de incorporación de LDL-Dil (Figura 5B y D).



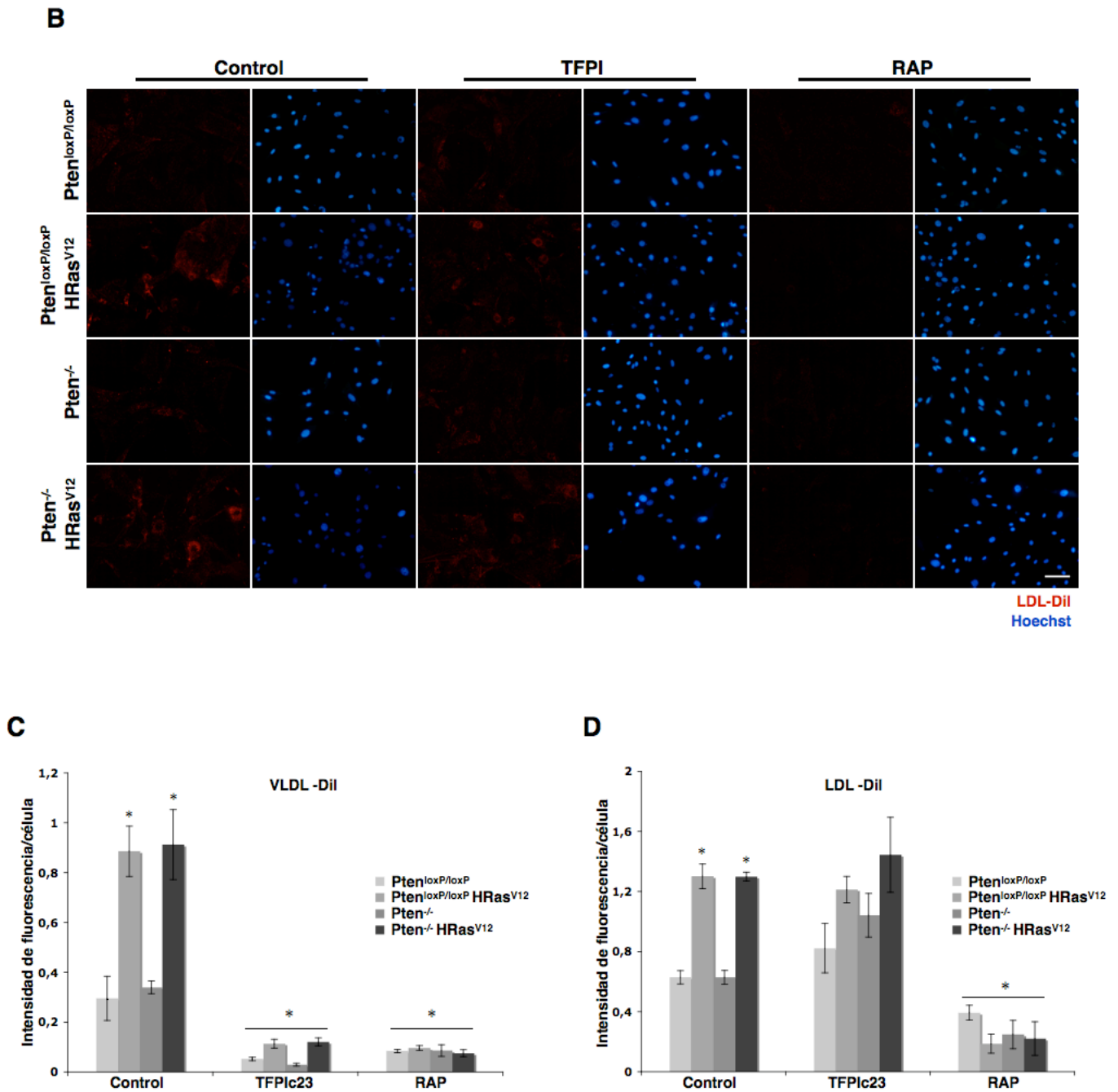


Figura 5: Incorporación de VLDL y LDL. Microfotografías de las células de los 4 grupos experimentales mantenidos en medio de cultivo suplementado con VLDL-Dil (control), VLDL-Dil y TFPIc23 5 μ M (TFPI) o VLDL-Dil y RAP 1 μ M (RAP). La barra representa 100 μ m **B.** Microfotografías de los cuatro grupos experimentales mantenidos en medio de cultivo suplementado con LDL-Dil (control), LDL-Dil y TFPIc23 5 μ M (TFPI) o LDL-Dil y RAP 1 μ M (RAP) La barra representa 100 μ m. La fluorescencia de las células expuestas a VLDL-Dil (**C**) o LDL-Dil (**E**) fue cuantificada y representada como media \pm EEM. Los datos fueron analizados con ANOVA two-way, tomando como factores el genotipo y el tratamiento (interacción $p < 0.0001$). Para las comparaciones entre grupos se utilizó el Bonferroni test (* $p < 0,01$ contra *Pten^{loxP/loxP}* control).

Una vez demostrada la capacidad de TFPIc23 y RAP de reducir la interacción de las lipoproteínas y sus receptores, estudiamos si estos polipéptidos presentaban algún tipo de efecto en el crecimiento celular. Nuestros datos mostraron que aunque con TFPIc23 desencadenaron una reducción significativa en crecimiento celular, ésta nunca fue superior al 30%, incluso a concentraciones elevadas del péptido (Figura 6A y B).

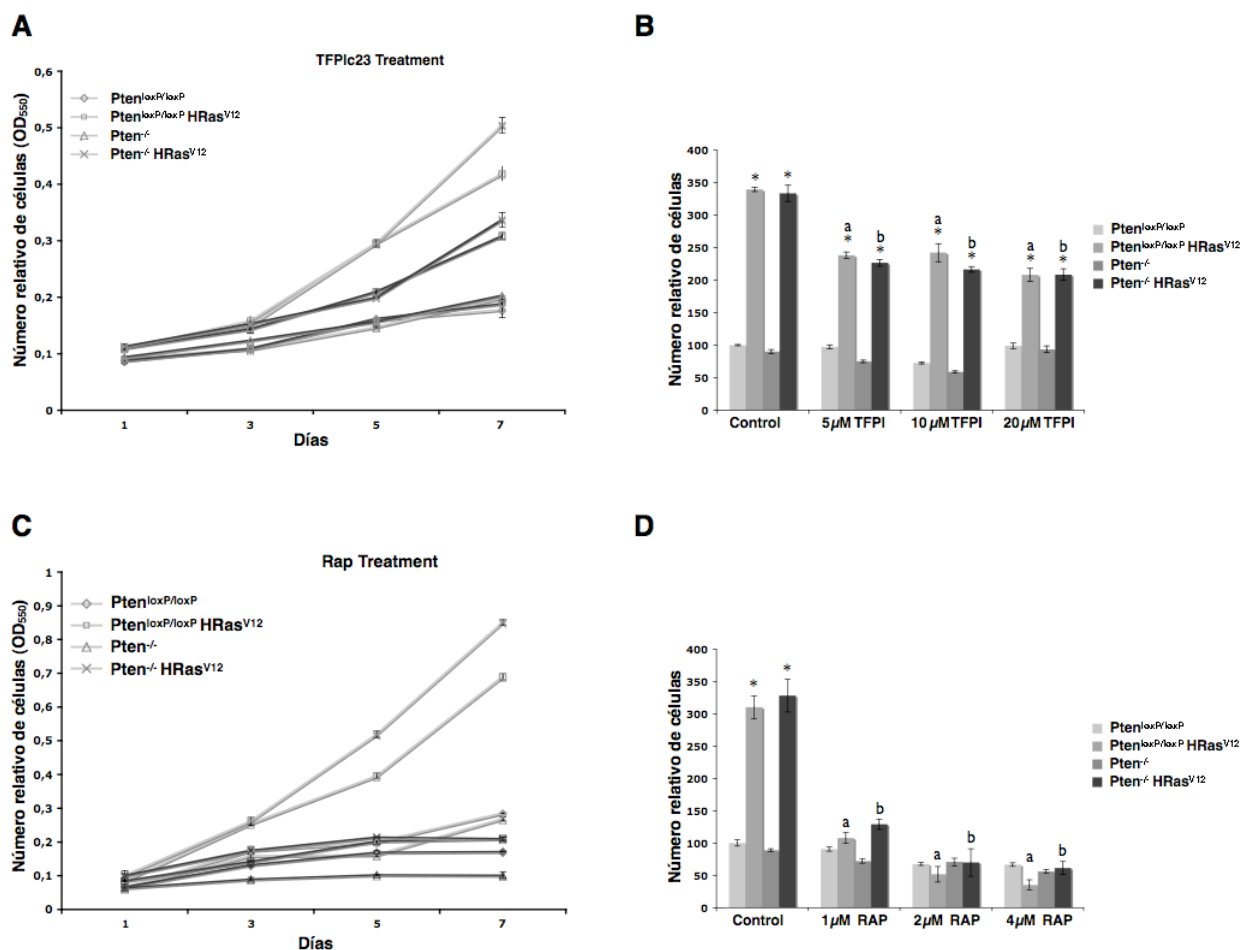


Figura 6: Efecto del bloqueo de VLDLr y LDLr sobre el crecimiento celular. **A.** Curva de crecimiento celular en presencia de CM (líneas grises) o en presencia de TFPIc23 5uM (líneas negras). **B.** Representación del número relativo de células tras ser mantenidas 7 días en CM (control) o tratadas con concentraciones crecientes de TFPIc23. **C.** Curva de crecimiento celular en presencia de CM (líneas grises) o en presencia de RAP 1uM (líneas negras). **D.** Representación del número relativo de células tras ser mantenidas 7 días en medio completo (control) o tratadas con concentraciones crecientes de RAP. Los datos han sido representados como media±EEM y fueron analizados con ANOVA two-way, tomando como factores el genotipo y el tratamiento (interacción $p < 0.0001$). Para las comparaciones entre grupos se utilizó el Bonferroni test (* $p < 0,005$ contra $Pten^{loxP/loxP}$ control, a $p < 0,05$ contra $Pten^{loxP/loxP}$ H-Ras^{V12} control. b $p < 0,05$ contra $Pten^{-/-}$ H-Ras^{V12} control).

Sin embargo pudimos observar una reducción muy marcada de la proliferación en presencia de RAP (figura 6C y D), demostrando que la expresión de Ras oncogénico y la delección de *Pten* incrementa la expresión de receptores de VLDL y LDL y esto

permite una mayor entrada de lípidos extracelulares, esenciales para el incremento de la proliferación celular.

Trabajos previos han mostrado una reducción de los niveles de fosforilación de ERK cuando las células se trataban con TFPIc23 proponiendo que el efecto antiproliferativo de TFPIc23 era consecuencia, al menos en parte, de esta disminución^[336]. Nosotros analizamos los niveles de fosforilación de ERK y de Akt en células no tratadas y tratadas a altas concentraciones de TFPIc23 (20 μ M). Como se puede observar en la Figura 7A no se encontraron cambios en los niveles de fosforilación de ninguna de estas dos proteínas, por lo que el efecto sobre el crecimiento celular fue causado probablemente por la incapacidad de las células para internalizar las lipoproteínas y no por la activación de la ruta de Raf/MEK/ERK o PI3K/Akt.

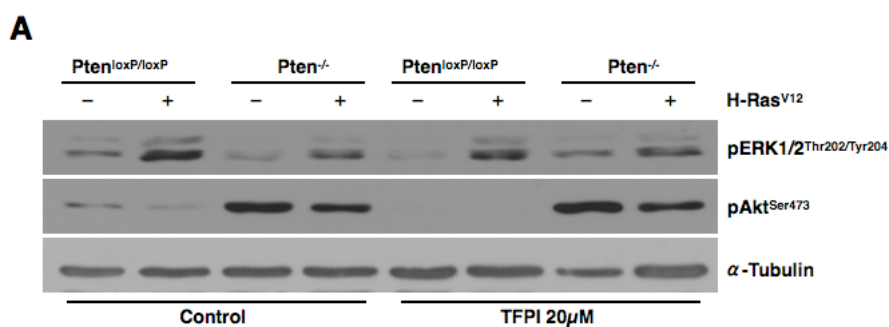


Figura7: Efecto de TFPIc23 sobre rutas de señalización. A. Niveles de fosforilación de ERK Akt y α -Tubulina. en medio de cultivo completo (control) o en presencia de TFPIc23 20 μ M.

1.3. Estado de la síntesis de lípidos y FA en presencia de eventos oncogénicos

En un amplio número de tipos tumorales se ha descrito una síntesis *de novo* de FA incrementada acompañada de altos niveles de FASN^[176-188]. Este hecho ha desencadenado la búsqueda de compuestos que permitan la inhibición de FASN como una estrategia antiproliferativa y antitumoral^[180, 314, 338, 339]. Sin embargo nuestras células con Ras oncogénico y/o delección de *Pten* presentan un fenotipo completamente dependiente de lípidos extracelulares. Este hallazgo en aparente contradicción con una

síntesis *de novo* de FA incrementada, nos llevó a analizar el estado del metabolismo de FA en la célula.

1.3.1 La expresión de Ras oncogénico y/o delección de *Pten* reduce la síntesis de lípidos en ausencia de lípidos extracelulares

La síntesis de lípidos totales se determinó como incorporación de ^{14}C procedente de glucosa marcada con la que se incubaron las células. Nuestros datos muestran que la expresión de Ras oncogénico aumentó significativamente la síntesis de lípidos. La delección de *Pten* no afectó estos parámetros (Figura 8A).

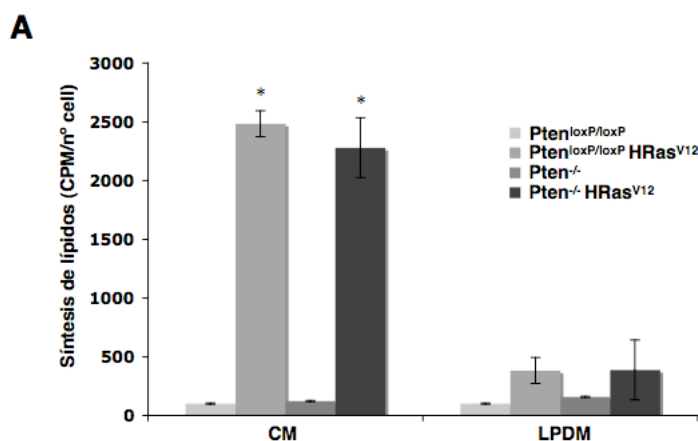


Figura 8: Síntesis de lípidos. A. Nivel de síntesis de lípidos de células mantenidas en medio completo (CM) o en LPDM. Los datos han sido representados como media±EEM. y fueron analizados con ANOVA two way, tomando como factores el genotipo y el tratamiento (interacción $p < 0.0001$). Para las comparaciones entre grupos se utilizó el Bonferroni test * $p < 0,005$ contra *Pten*^{loxP/loxP}.

Sin embargo, la incubación de las células en LPDM produjo una reducción significativa de la síntesis de lípidos en los grupos experimentales que expresaban Ras oncogénico (Figura 8A), lo cual implicaba un bajo nivel de síntesis *de novo* de FA en estas células y una dependencia para la síntesis de lípidos de los lípidos extracelulares. Estudiamos entonces más detalle la ruta de síntesis de FA, determinando los niveles y la actividad de dos enzimas principales de esta ruta metabólica: FASN y ACC.

FASN es una de las tres enzimas implicadas en la síntesis de FA en la célula, y es considerada como la enzima clave en este proceso. Numerosos trabajos han demostrado

una elevada expresión de FASN en un amplio rango de tipos tumorales, llegando a ser propuesta esta enzima como un marcador tumoral^[176-188]. Asimismo los niveles y actividad de FASN junto con la determinación de síntesis de lípidos a partir de glucosa se utilizan en la mayoría de los trabajos actuales como una medida de los niveles de síntesis *de novo* de FA^[312, 340]. Nuestros datos muestran un gran aumento de los niveles de FASN principalmente en los grupos experimentales que expresan *H-Ras*^{V12}, pero también en los que se delecciona *Pten*. (Figura 9A). Asimismo determinamos los niveles de SREBP procesado, el principal factor de transcripción que regula la expresión de FASN. Como se muestra en la Figura 9A los niveles de SREBP aparecen aumentados en aquellos grupos que expresan Ras oncogénico, correlacionándose con los niveles de FASN.

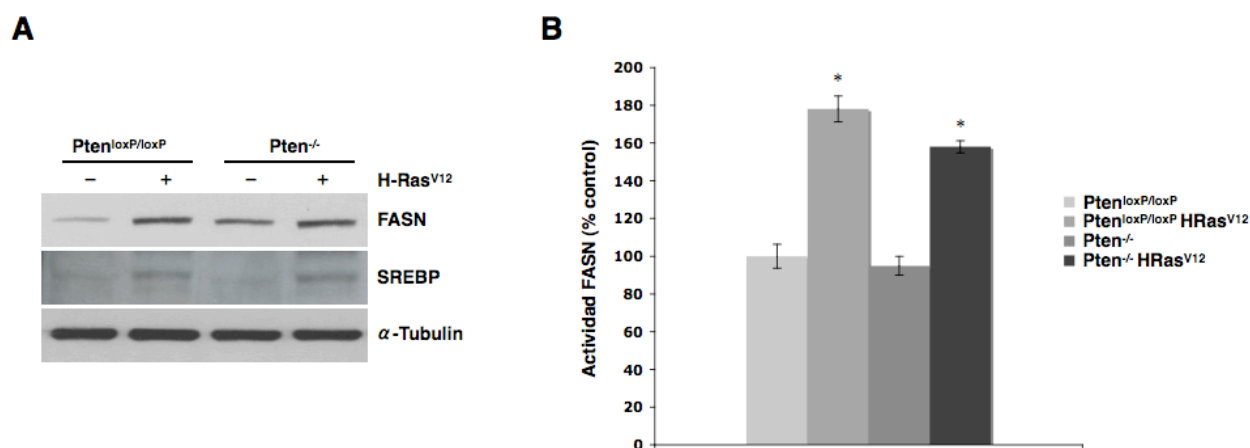


Figura 9: Efecto de los eventos oncogénicos sobre FASN. A. Niveles de FASN, SREBP (forma nuclear) y α -Tubulina. **B.** Niveles de actividad de FASN en los cuatro grupos experimentales. Los datos han sido expresados como porcentaje en relación al grupo *Pten*^{loxP/loxP}. * $p < 0,001$ contra *Pten*^{loxP/loxP} (One-way ANOVA Bonferroni's post test).

Clásicamente la regulación de FASN se ha descrito exclusivamente a nivel transcripcional de forma que sus niveles se relacionan de forma directa con su actividad. Sin embargo algunos trabajos han observado una reducción de actividad del enzima por modificaciones postraduccionales^[341]. Mediante la determinación de los niveles de actividad de FASN tanto con el método espectrofotométrico (Figura 9B) como con marcaje radiactivo (datos no mostrados), hemos observado una alta actividad del enzima en los grupos que expresan Ras oncogénico reflejando la existencia de un enzima totalmente funcional. Este dato descarta la posible inhibición de la actividad de

FASN como responsable del bajo nivel de síntesis de lípidos observada en nuestro modelo.

1.3.2 Las células que expresan H-Ras^{V12} y/o delecionan *Pten* presentan un bajo nivel de síntesis *de novo* de FA debido a la inhibición de la ruta a nivel de ACC

Dada la correlación entre los niveles y actividad de FASN en los cuatro grupos experimentales, decidimos analizar el estado del enzima anterior en la ruta de síntesis de FA, ACC. Nuestros resultados muestran un gran aumento de la forma fosforilada en Ser79 de ACC en los grupos experimentales *Pten*^{loxP/loxP}*H-Ras*^{V12} y *Pten*^{-/-}*H-Ras*^{V12}, existiendo también un ligero incremento en las células *Pten*^{-/-} (Figura 10A). No hemos observado cambios consistentes en los niveles totales de ACC (Figura 10A). Es ampliamente conocido que la fosforilación de ACC en Ser79 inhibe su actividad enzimática^[342]. Con el fin de estudiar si la fosforilación de ACC era suficiente para mantener unos bajos niveles de actividad de la ruta de síntesis *de novo* de FA incluso en presencia de altos niveles de FASN, determinamos la actividad acoplada de ACC-FASN. Como se observa en la figura 10B, la expresión de Ras oncogénico reduce la actividad de ACC-FASN. Estos datos indican que aunque los eventos oncogénicos descritos aumentan los niveles de FASN la ruta de síntesis *de novo* de FA está inhibida a nivel de ACC como consecuencia del aumento de su fosforilación. La actividad acoplada de ambas enzimas ACC-FASN no aumentó incluso cuando las células fueron incubadas en LPDM, lo cual explica la reducción en la síntesis de lípidos que observamos en células que expresan Ras oncogénico cuando se incuban en este medio con depleción en lipoproteínas (Figura 10B). Esto implica que las células que expresan Ras oncogénico y/o delecionan *Pten* dependen por completo de lípidos extracelulares, siendo incapaces de suplir su deficiencia mediante la síntesis *de novo* de FA.

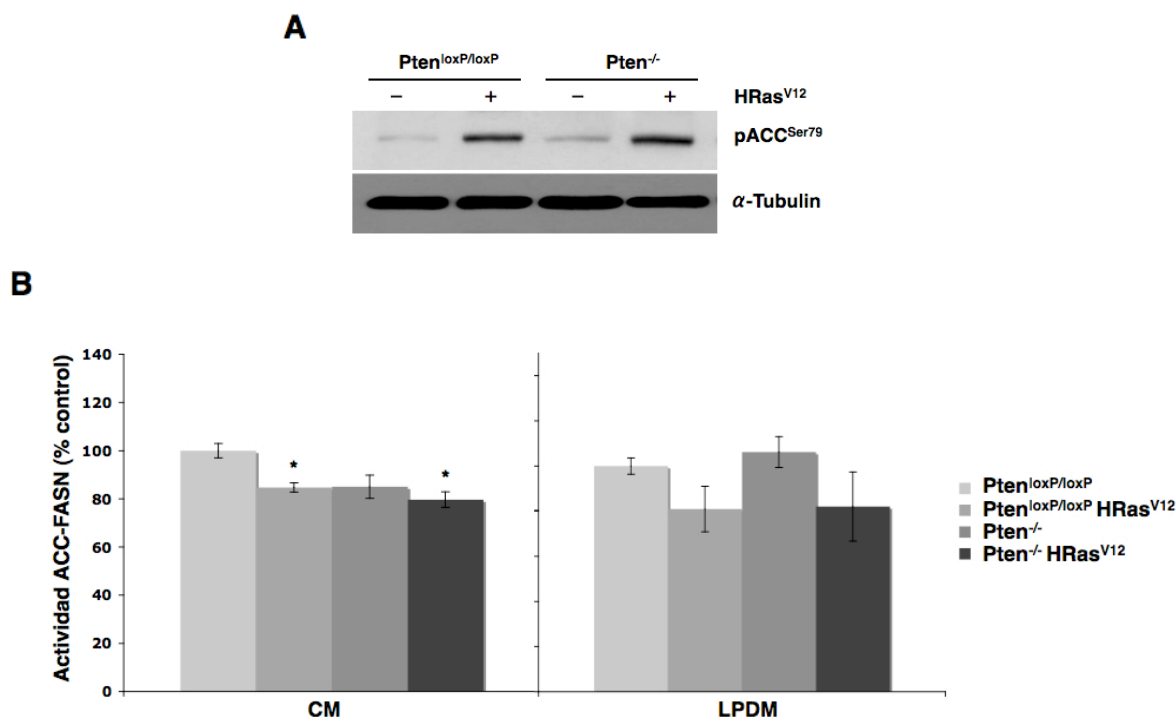


Figura 10: Papel de ACC en la síntesis de FA. A. Tubulina. **B.** Actividad acoplada ACC-FASN en células mantenidas en CM o en LPDM. Los datos han sido representados porcentaje en relación a Pten^{loxP/loxP}. * p<0.05 vs Pten^{loxP/loxP} (One-way ANOVA, Bonferroni post test).

1.3.3 El aumento de los niveles de pAMPK en las células que expresan Ras oncogénico es responsable de la inhibición de la síntesis de FA

AMPK es un regulador del metabolismo celular, inhibiendo la ruta de síntesis *de novo* de FA por fosforilación directa de ACC^[343]. Para elucidar si AMPK era responsable de la inhibición de la síntesis de FA observada en las células con Ras oncogénico, determinamos los niveles proteicos de la forma activa de AMPK (pAMPK^{Thr172}). Las células, sobre todo aquellas que expresan Ras oncogénico, presentaron un elevado nivel de pAMPK^{Thr172} y este incremento se correlacionó con los niveles de pACC^{Ser79} (Figura 11A y B). Trabajos previos han demostrado que la fosforilación y activación de AMPK es favorecida por bajos niveles de ATP en la célula. Sin embargo en nuestras células, la activación de AMPK no parece debida a la disminución de nutrientes y consiguiente reducción del ATP celular, ya que los niveles de pAMPK^{Thr172} fueron similares en células mantenidas 7 días en cultivo (con disminución de nutrientes) o mantenidas 24 horas en medio fresco tras 6 días en cultivo (altos niveles de nutrientes) (Figura 11A).

Esto parece indicar que la activación de AMPK en nuestras células es causa directa del proceso oncogénico, y no de la depleción energética. Además la reducción de lipoproteínas en el medio de cultivo no disminuyó la fosforilación de AMPK o ACC, lo que se correlaciona con el hecho de que la ruta de síntesis *de novo* de FA se mantenga inhibida en estas circunstancias, como ya habíamos demostrado mediante la determinación de la actividad ACC-FASN (Figura 10B).

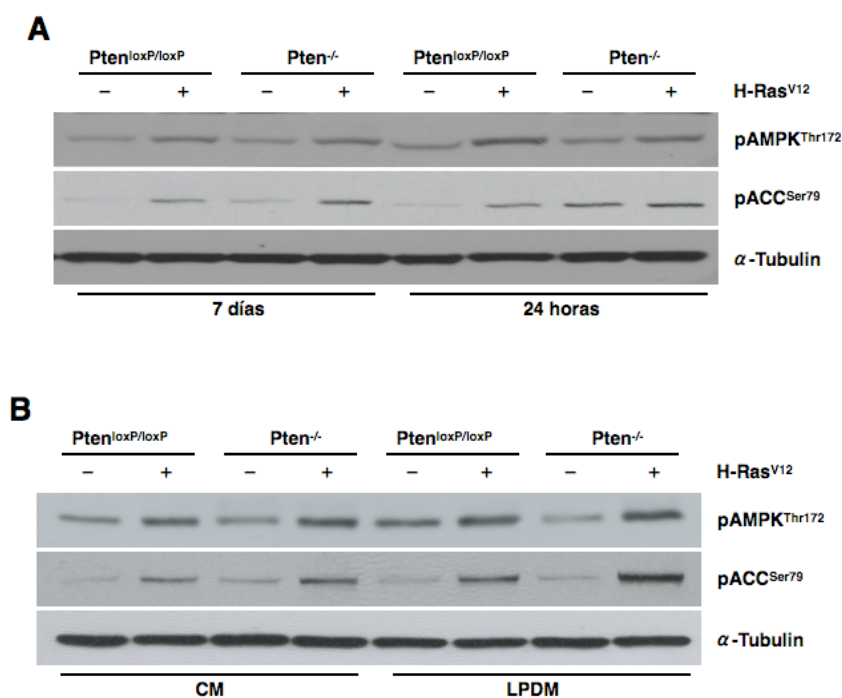


Figura 11: AMPK y regulación de la síntesis de FA. **A.** Niveles de pAMPK^{Thr172}, pACC^{Ser79} y α-Tubulina a los 7 días de cultivo, o 24 horas tras el cambio de medio de cultivo. **B.** Niveles de pAMPK^{Thr172}, pACC^{Ser79} y α-Tubulina. en CM o en ausencia de lipoproteínas (LPDM).

1.4 Papel de AMPK sobre proliferación

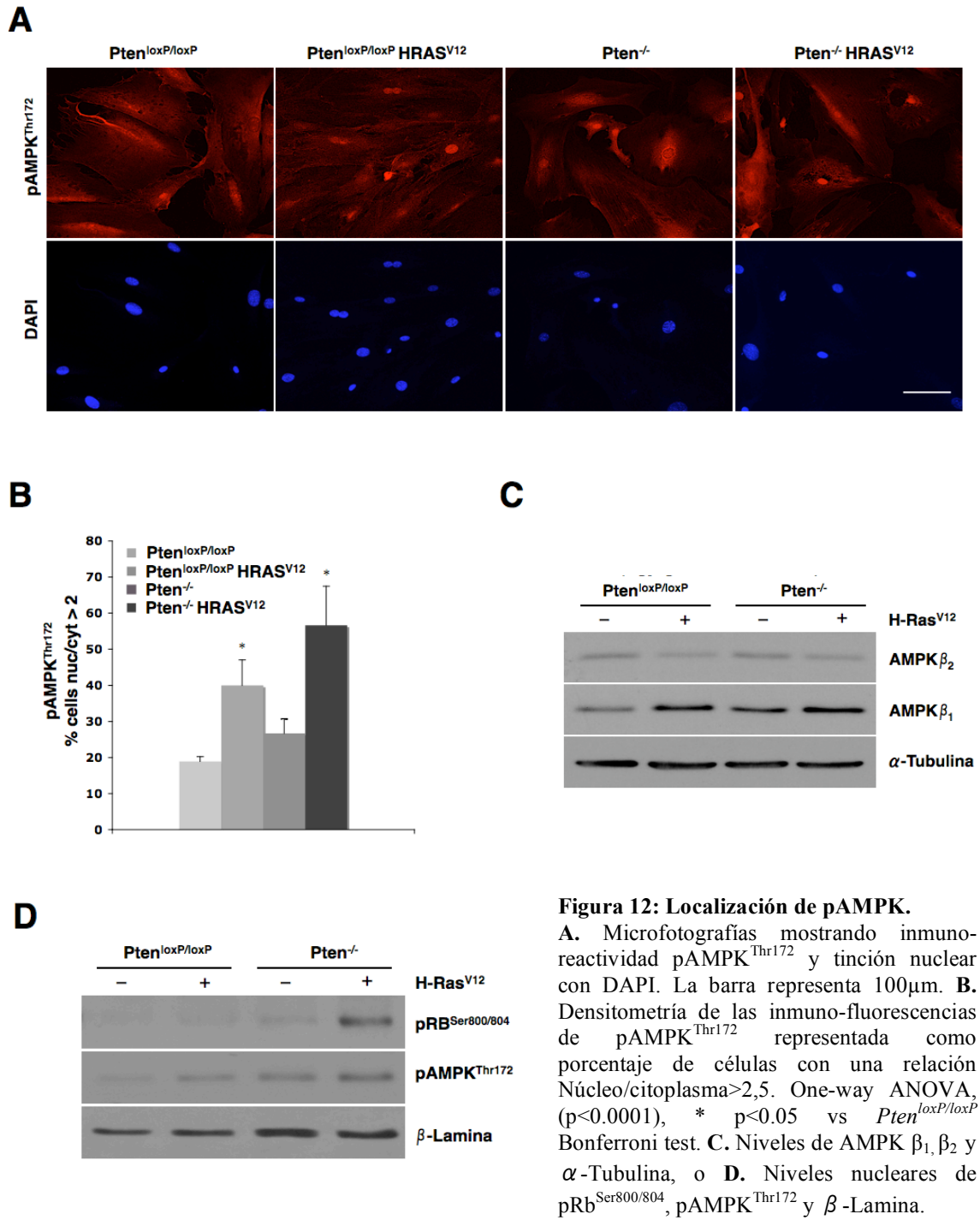
Nuestros datos muestran que la expresión de Ras oncogénico desencadena el aumento de los niveles de pAMPK en las células, siendo mucho menor el efecto de la delección de *Pten*. Este incremento se mantiene incluso con bajos niveles de lípidos extracelulares, lo que en principio parecería desventajoso para la célula en esta situación. Este hecho nos llevó a plantearnos que AMPK podría estar regulando otro tipo de rutas importantes en la célula. Trabajos previos han mostrado una amplia lista de funciones de AMPK incluyendo la regulación de la apoptosis, proliferación y crecimiento celular, entre

otros, y su activación ha sido propuesta como diana teurapeutica en cáncer^[344]. Además, recientemente se ha evidenciado que AMPK presenta un papel muy relevante en el desarrollo del sistema nervioso de ratón, mediado por su capacidad de fosforilar a Rb^[299]. Con estos antecedentes estudiamos el posible papel de AMPK en la regulación del ciclo celular en un contexto oncogénico.

1.4.1 La expresión de H-Ras^{V12} aumenta los niveles de pAMPK^{Thr172} nuclear y la fosforilación de Rb

Uno de los puntos de regulación que pueden condicionar los efectos de AMPK es su localización celular. Diferentes trabajos han mostrado que algunos estímulos pueden translocar AMPK al núcleo celular^[263-265]. Con el fin de conocer si la localización de AMPK podía verse afectada por la delección de *Pten* o expresión de Ras oncogénico, realizamos inmunofluorescencia para pAMPK^{Thr172} en estas células. Nuestros datos mostraron un aumento significativo de los niveles de pAMPK^{Thr172} nuclear con la expresión de H-Ras^{V12}. En células con *Pten* deleccionaso el efecto no fue significativo (Figura 12A, 12B). Con estos resultados y dado que se ha relacionado la localización nuclear de AMPK con la subunidad β_1 ^[299], determinamos los niveles de las subunidades β de AMPK. Tal y como se puede observar en la Figura 12C, la expresión de Ras oncogénico desencadenó una reducción de los niveles de AMPK β_2 y un aumento de la subunidad AMPK β_1 . La delección de *Pten* solo afectó a los niveles de AMPK β_1 (Figura 12C). Asimismo, la translocación y acúmulo de pAMPK a nivel nuclear pudo ser corroborado mediante la determinación de los niveles proteicos de pAMPK en extractos nucleares (Figura 12D).

Puesto que el heterotrímico de AMPK conteniendo la subunidad β_1 se ha relacionado con la proliferación neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso de ratón por favorecer la fosforilación Rb en Ser800/804, determinamos sus niveles en extractos nucleares observando un aumento de pRb^{Ser800/804} en los grupos que expresaban Ras oncogénico (Figura 12D).



1.4.2 La inhibición de AMPK reduce el crecimiento celular

Con el objetivo de estudiar el posible papel de AMPK nuclear sobre la proliferación y crecimiento celular, inhibimos y activamos AMPK en nuestras células con compuesto C (inhibidor) y AICAR (activador). En primer lugar realizamos curvas dosis-respuesta para determinar la mínima dosis efectiva de estos compuestos sin efectos tóxicos (Figura 13A y B). Los experimentos fueron realizados a las concentraciones más bajas de estos compuestos (10 μ M compuesto C y 0,2mM AICAR) y eficaces en la inhibición y activación de AMPK respectivamente. Con el fin de estudiar el efecto de AMPK en la capacidad proliferativa de las células, determinamos la incorporación de BrdU en células tratadas y no tratadas con ambos compuestos tras 24 horas en cultivo. La expresión de Ras oncogénico desencadenó un incremento de los niveles de incorporación de BrdU que se relacionan con las curvas de crecimiento mostradas previamente (Figura 2B y 13C). El tratamiento con AICAR durante 24 horas no indujo cambios significativos en el nivel de incorporación de BrdU en relación con los grupos no tratados (Figura 13C). Sin embargo la administración de compuesto C durante 24 horas redujo significativamente el número de células positivas para BrdU en los grupos *Pten*^{loxP/loxP}*H-Ras*^{V12} y *Pten*^{-/-}*H-Ras*^{V12} (Figura 13C), lo que parece indicar la existencia de una regulación del ciclo celular vía AMPK.

Dado que Rb es el mayor regulador del paso de G1 a S, y puesto que habíamos observado una correlación entre sus niveles de fosforilación y pAMPK, determinamos los niveles de la pRb^{Ser800/804} en los astrositos tratados con AICAR y AMPK. Mediante IF demostramos que los niveles de pRb^{Ser800/804} no presentan cambios tras 24 horas de tratamiento con AICAR. Por el contrario, después de 24 horas de ser administrado el compuesto C observamos una reducción de los niveles de la fosforilación de Rb en todos los grupos experimentales (Figura 13D). Este resultado fue confirmado mediante la determinación de los niveles de pRb^{Ser800/804} por Western blot (Figura 13E). Estos datos nos permiten concluir que tratamientos con compuesto C reducen la proliferación de astrositos que expresan Ras oncogénico, al menos en parte, por reducir la actividad de AMPK y por tanto disminuir los niveles de pRb^{Ser800/804}.

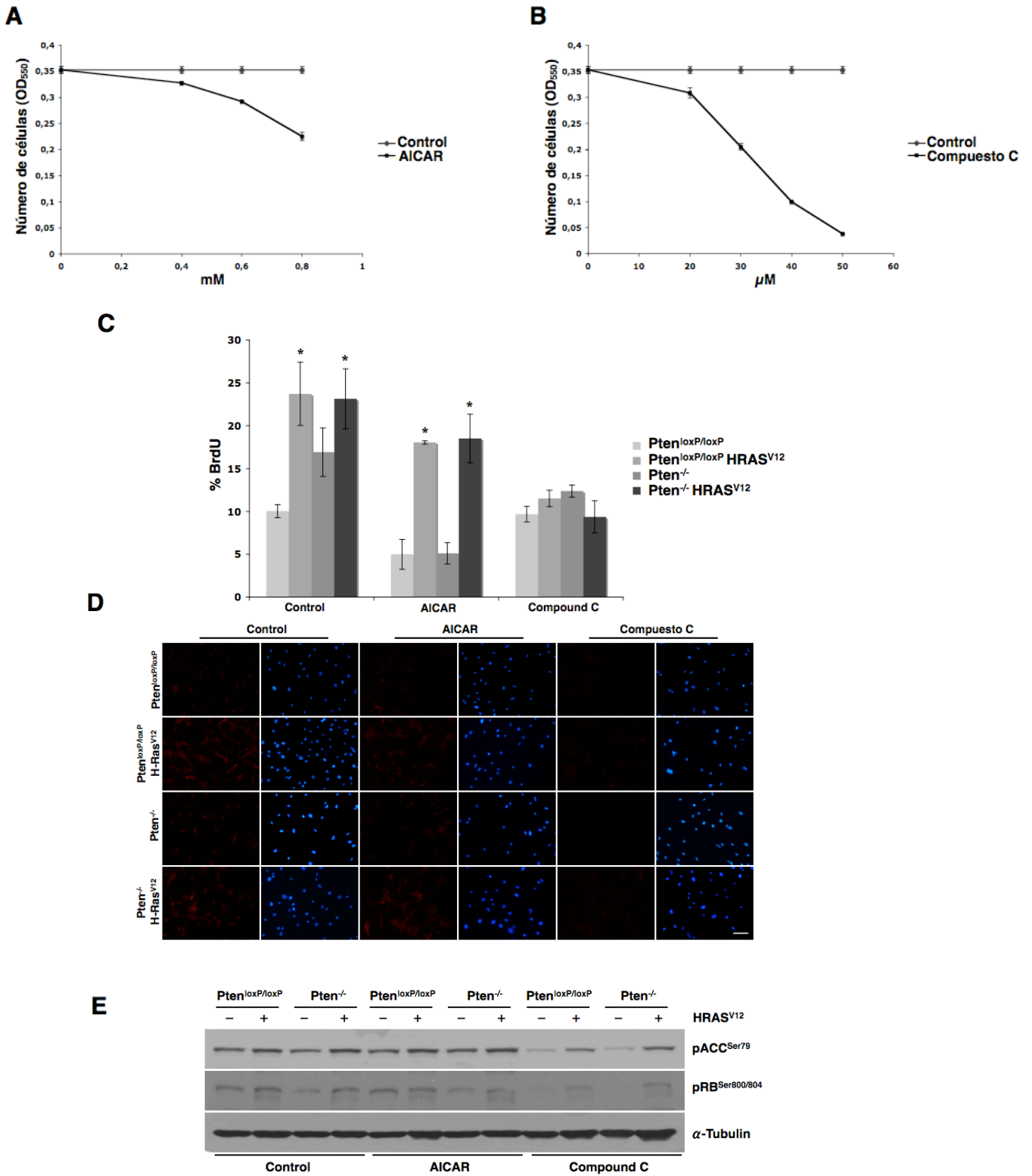


Figura 13: Efecto de AICAR y compuesto C sobre proliferación. **A.** Número relativo de células *Pten*^{loxP/loxP} tras haber sido mantenidas durante 72 horas en medio de cultivo completo, tratadas con AICAR o **(B)** compuesto C a concentraciones crecientes. **C.** Porcentaje de células BrdU positivas a las 24 horas de ser expuestas a medio completo (control) tratadas con AICAR o compuesto C. Los datos fueron analizados con ANOVA two-way, tomando como factores el genotipo y el tratamiento (interacción $p=0.0002$). * $p<0,001$ contra *Pten*^{loxP/loxP} en las mismas condiciones (Bonferroni post test). **D.** Microfotografías mostrando inmunoreactividad pRb^{Ser800/804} y tinción nuclear con DAPI en células control, tratadas con AICAR o compuesto C. La barra representa 100µm. **E.** Niveles de pRb^{Ser800/804}, pACC^{Ser79}, y α-Tubulina en células mantenidas bajo condiciones control, tratadas con AICAR o compuesto C durante 24 horas. Las concentraciones usadas han sido 0,2mM AICAR y 10µM compuesto C.

2. Deleción de AMPK y Expresión de Ras oncogénico como modelo experimental

Ya que había sido demostrado por otros autores que tanto AICAR como compuesto C presentan efectos independientes de AMPK^[345-347], utilizamos un modelo genético de deleción de AMPK para elucidar el papel real de este enzima sobre la proliferación celular. Aunque la deleción de *Pten* afectó a algunos de los parámetros estudiados en este trabajo, la expresión de H-Ras^{V12} presentó muchos mayores efectos sobre pAMPK, pRb y proliferación celular. Por este motivo decidimos trabajar con un modelo de deleción de AMPK en presencia de Ras oncogénico sin incluir la deleción de *Pten* en el nuevo modelo. Para ello realizamos cultivos primarios en monocapa de astrocitos neonatales de ratón los cuales fueron utilizados para obtener los cuatro grupos experimentales (AMPK^{losP/loxP}, AMPK^{losP/loxP}H-Ras^{V12}, AMPK^{-/-} y AMPK^{-/-}H-Ras^{V12}), tal y como se indicó en material y métodos.

2.1. Caracterización de la deleción de AMPK α y expresión de Ras oncogénico

Al igual que con el modelo anterior, la eficiencia de infección fue determinada en primer lugar mediante la visualización de la expresión de EGFP, pudiendo comprobar la existencia de un porcentaje de infección superior al 90% en todos los grupos experimentales. La correcta infección con H-Ras^{V12} se determinó mediante la detección de los niveles proteicos de H-Ras total por western blot y por la observación del característico cambio morfológico producido por su expresión en astrocitos (Figura 14). Asimismo la deleción de las subunidades α de AMPK se determinó mediante western blot y la reducción de la actividad de esta enzima fue demostrada mediante la determinación de los niveles de pACC^{Ser79} (Figura 14).

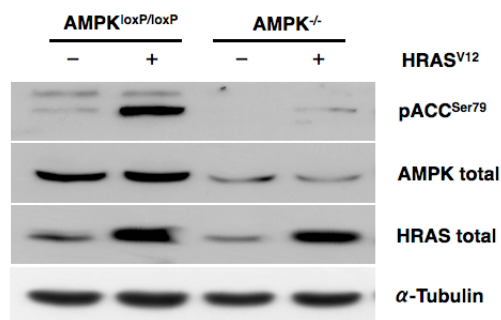


Figura 14: Caracterización del modelo celular. Niveles de pACC^{Ser79}, AMPK α 1/2, H-Ras total y α -Tubulina.

2.2. La delección de AMPK reduce el crecimiento celular

Con el fin de conocer si la delección de AMPK tenía algún efecto sobre la capacidad proliferativa de astrocitos normales o aquellos infectados con Ras oncogénico, realizamos curvas de crecimiento celular. La ausencia de AMPK no afectó significativamente la proliferación de los astrocitos normales. Sin embargo, el efecto estimulador de la expresión de H-Ras^{V12} sobre la proliferación celular se redujo significativamente cuando las células perdieron AMPK (Figura 15A y B). Asimismo, la delección de AMPK redujo el número de células estrelladas características de la infección con H-Ras^{V12}, así como el número de colonias que estas formaban (Figura 15A). La delección de AMPK no afectó a los niveles de apoptosis de las células (datos no mostrados), aunque pudimos detectar un leve incremento de los niveles de senescencia en el grupo AMPK^{-/-}H-Ras^{V12}, sin embargo este dato no explica el lento crecimiento mostrado por estas células. (Figura 15C).

2.3. El efecto de la delección de AMPK sobre proliferación está mediado por Rb

Con el objetivo de estudiar las bases moleculares responsables del efecto de AMPK sobre proliferación, determinamos los niveles de incorporación de BrdU en estas células.

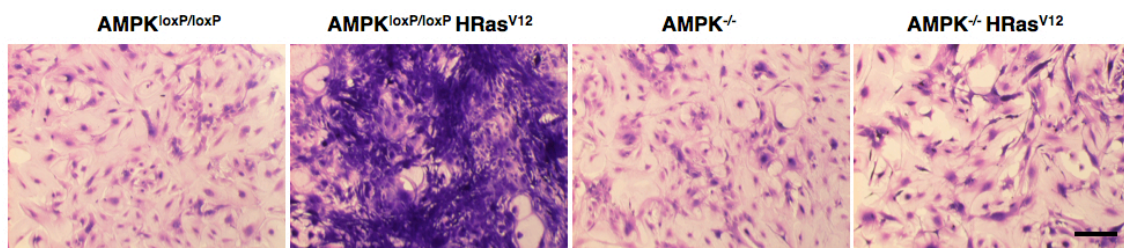
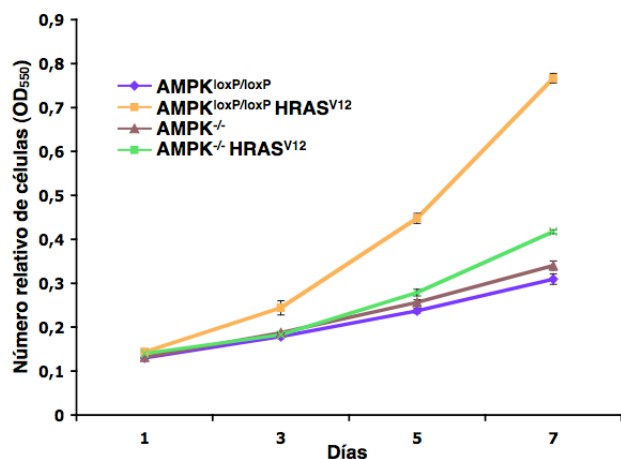
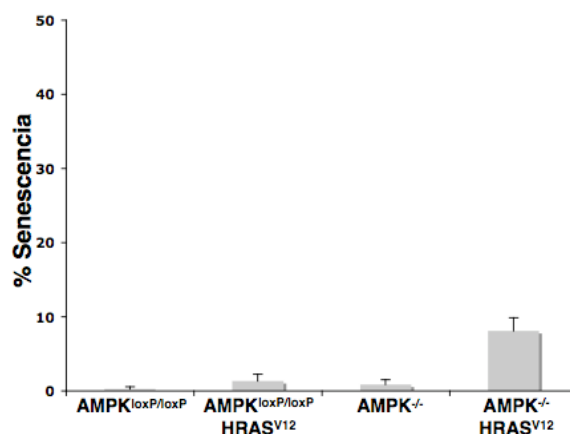
A**B****C**

Figura 15: Efecto de la delección de AMPK sobre crecimiento celular. A. Microfotografías de las células de los 4 grupos experimentales mantenidos durante 7 días en medio de cultivo completo. La barra representa 100 μ m. B. Curva de crecimiento celular mostrando el número relativo de células en los cuatro grupos experimentales. C. Niveles de senescencia a los 7 días de cultivo. Los datos han sido representados como media \pm EEM.

Nuestros datos demostraron que la delección de AMPK reducía dramáticamente los niveles de incorporación de BrdU en aquellas células que expresaban Ras oncogénico, disminuyendo estos niveles hasta los del grupo control (Figura 16A). Además y tal y como se observa en la figura 16B, la pérdida de AMPK demostrada por los bajos niveles de pACC^{Ser79} desencadenaba la reducción de los niveles de fosforilación de Rb en los residuos Ser800/804 descritos como diana de AMPK. Estos datos demuestran que AMPK presenta un importante papel en la regulación de la proliferación celular, al menos en astrocitos de ratón que expresan Ras oncogénico.

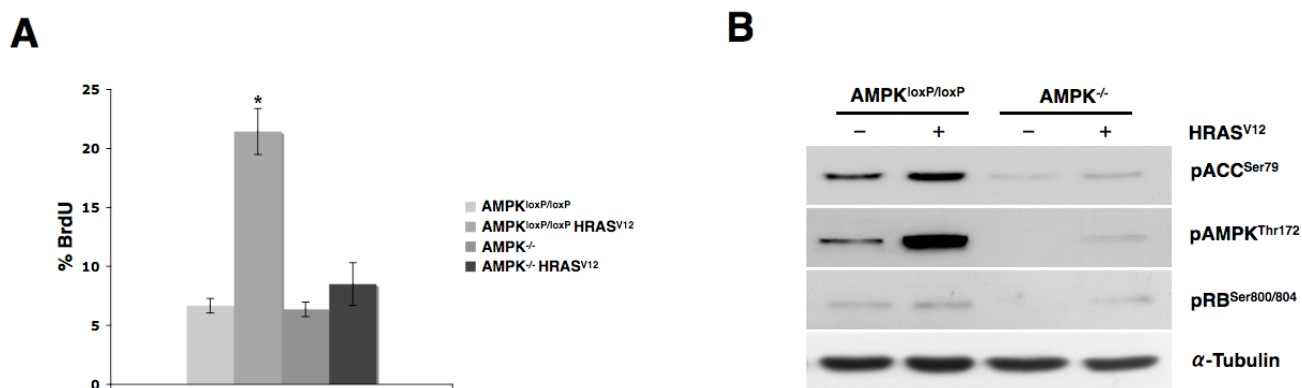


Figura 16: Efecto de la delección de AMPK sobre proliferación. **A.** Niveles de incorporación de BrdU de los cuatro grupos experimentales. **B.** Niveles de pRb^{Ser800/804}, pACC^{Ser79}, pAMPK^{Thr172}, y α -Tubulina. Los datos han sido representados como media \pm EEM. Los datos fueron analizados con ANOVA one-way, ($p < 0,0001$) y para las comparaciones entre grupos se utilizó el Bonferroni test * $p < 0,001$ contra AMPK^{loxP/loxP}.

3. Papel de AMPK en líneas de glioma humano

Una vez demostrado que AMPK era esencial para mantener la proliferación de cultivos primarios de astrocitos de ratón que expresaban Ras oncogénico, realizamos experimentos con células tumorales humanas, en concreto con dos líneas celulares de glioblastomas (U87MG y U373MG). En estas células disminuimos la actividad de AMPK usando dos estrategias diferentes: mediante la utilización de compuesto C y mediante el uso de siRNAs contra AMPK.

3.1 Compuesto C inhibe la proliferación de líneas de glioma humano

Con el fin de determinar el papel de AMPK en estas líneas, inhibimos la actividad de este enzima con compuesto C. Dosis bajas de compuesto C (10 μ M) redujeron significativamente la proliferación de ambas líneas celulares, manteniéndose este efecto como mínimo durante 7 días (Figura 17A, B y C). También se observó una reducción del número de colonias en la línea U87MG, probablemente reflejando una pérdida de agresividad de las células (Figura 17A). Al igual que en los astrocitos de ratón, la inhibición de AMPK disminuyó la capacidad de las células de incorporar BrdU sin

afectar a los niveles de senescencia y apoptosis (Figura 17D). Asimismo nuestros datos mostraron que la causa de la reducción de la incorporación de BrdU en las células tratadas con este compuesto estaba mediada, al menos en parte, por la reducción de los niveles de Rb fosforilado en Ser 807/811 (que se corresponde con la Ser800/804 en ratón; Figura 17E).

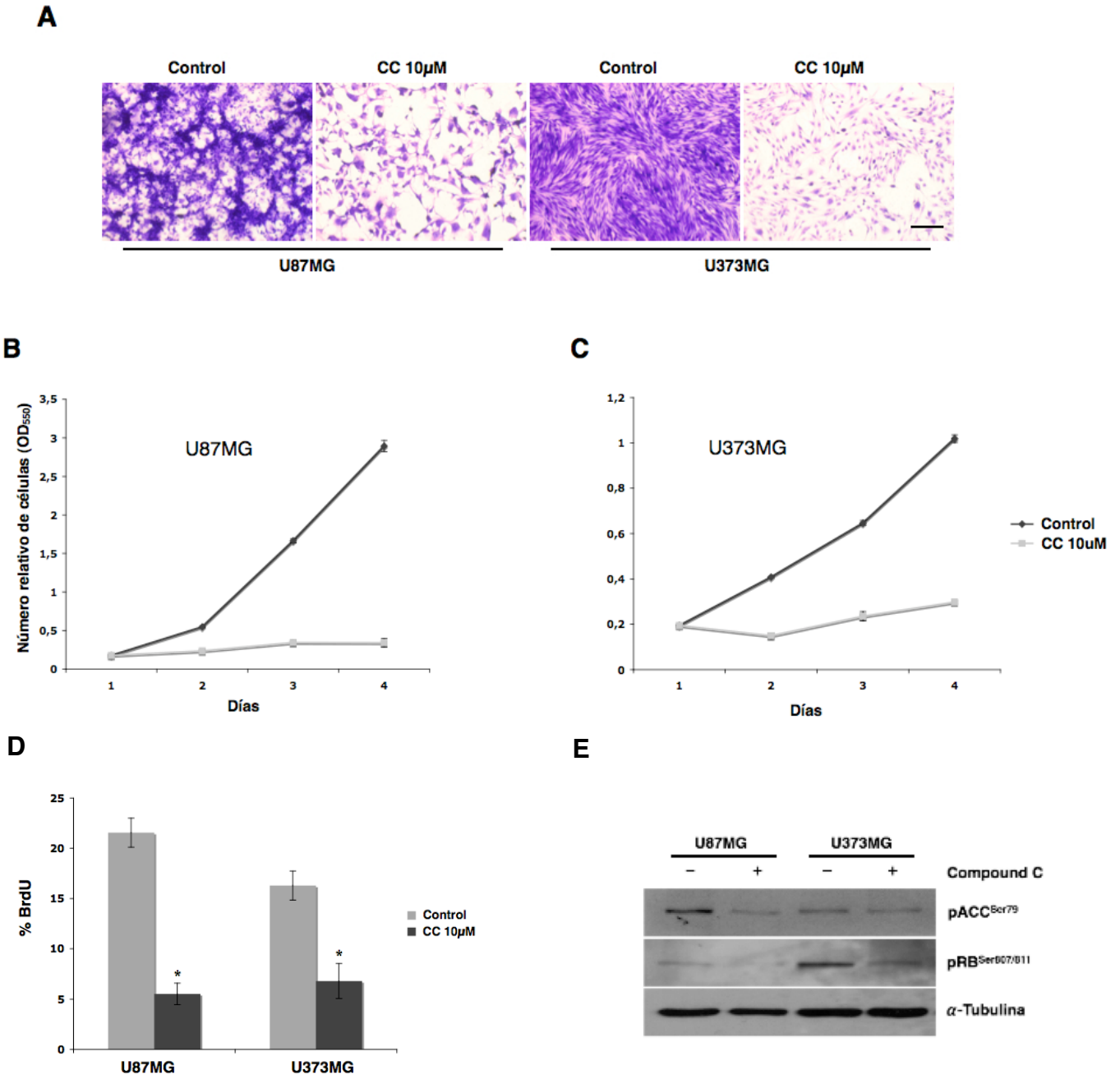


Figura 17: Efecto de compuesto C en líneas de glioma humano. **A.** Microfotografías de las dos líneas celulares mantenidas durante 7 días en medio control, o tratadas con compuesto C (10µM). La barra representa 100µm. **B.** Curva de crecimiento celular en presencia o ausencia de compuesto C en las líneas U87MG o **(C)** U373MG. **D.** Niveles de Incorporación de BrdU en las líneas U87MG y U373MG a los 7 días de cultivo. **E.** Niveles de pACC^{Ser79}, pRb^{Ser807/811}, α-Tubulina en estas células. Los datos fueron analizados con *t*-test * $p < 0,0001$ contra condiciones control.

3.2 El silenciamiento de AMPK reduce la proliferación en líneas celulares de glioma humano

Además de la inhibición mediante compuestos químicos, llevamos a cabo experimentos de inhibición de la expresión de AMPK utilizando para ello siRNAs específicos contra las subunidades catalíticas de este enzima. Cuarenta y ocho horas tras la transfección de las células los niveles de AMPK α y pACC se encontraron reducidos tanto a 10 nM como a 20 nM de siRNA. A continuación analizamos la capacidad de incorporación de BrdU en células control y transfectadas con siRNA contra AMPK, pudiendo observar una disminución significativa de ésta en ambas líneas celulares (Figura 18A). Finalmente pudimos observar que, al igual que en el modelo de ratón, la disminución de los niveles de AMPK iban acompañados de una reducción de la fosforilación de Rb en las líneas celulares U87MG y U373MG a una concentración de 10nM y 20nM siRNA (Figura 18B). Estos datos demuestran que AMPK presenta un importante papel sobre la capacidad proliferativa de líneas de glioma humano, y este efecto está mediado, al menos en parte, por su papel sobre Rb.

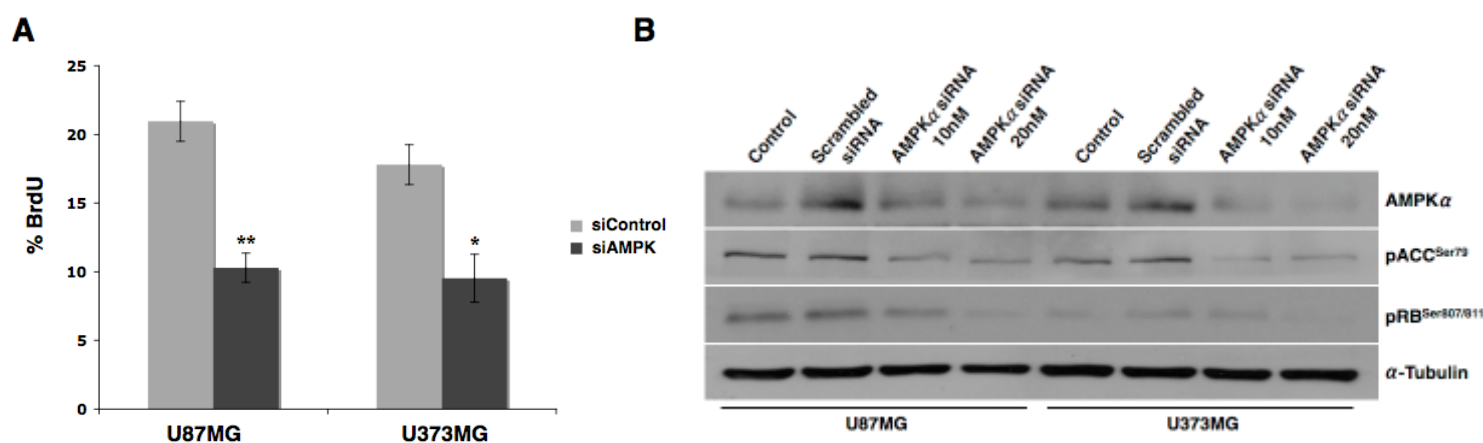


Figura 18: Efecto del silenciamiento de AMPK en líneas de glioma humano. **A.** Niveles de incorporación de BrdU en las líneas U87MG y U373MG a las 48 horas tras la transfección. Los datos fueron analizados con *t*-test * $p < 0,0026$, ** $p < 0,0001$ contra condiciones control. **B.** Niveles de AMPK α 1/2, pACC^{Ser79}, pRb^{Ser807/811}, α -Tubulina.

3.3 El Compuesto C reduce el crecimiento de gliomas humanos *in vivo*

Nuestros datos demuestran que la inhibición de AMPK reduce el crecimiento de astrocitos de ratón que expresan Ras oncogénico, así como en líneas de glioma humano *in vitro*. Sin embargo, los diferentes tipos de estrés que experimentan las células de tumores sólidos *in vivo* (hipoxia y estrés metabólico) podrían afectar el papel de AMPK en la biología tumoral. Para determinar el efecto de la inhibición de AMPK por compuesto C *in vivo*, realizamos inyecciones de las líneas tumorales de glioma humano utilizadas en ratones inmunodeficientes (SCID) con el fin de obtener tumores. Inyecciones subcutáneas de $2,5 \times 10^6$ células de la línea U87MG formaron tumores en un corto periodo de tiempo (4 días). Como previamente había sido descrito por otros autores^[348], no fuimos capaces de obtener tumores de la línea U373MG inyectando células en un rango de $2,5 \times 10^6$ - 20×10^6 .

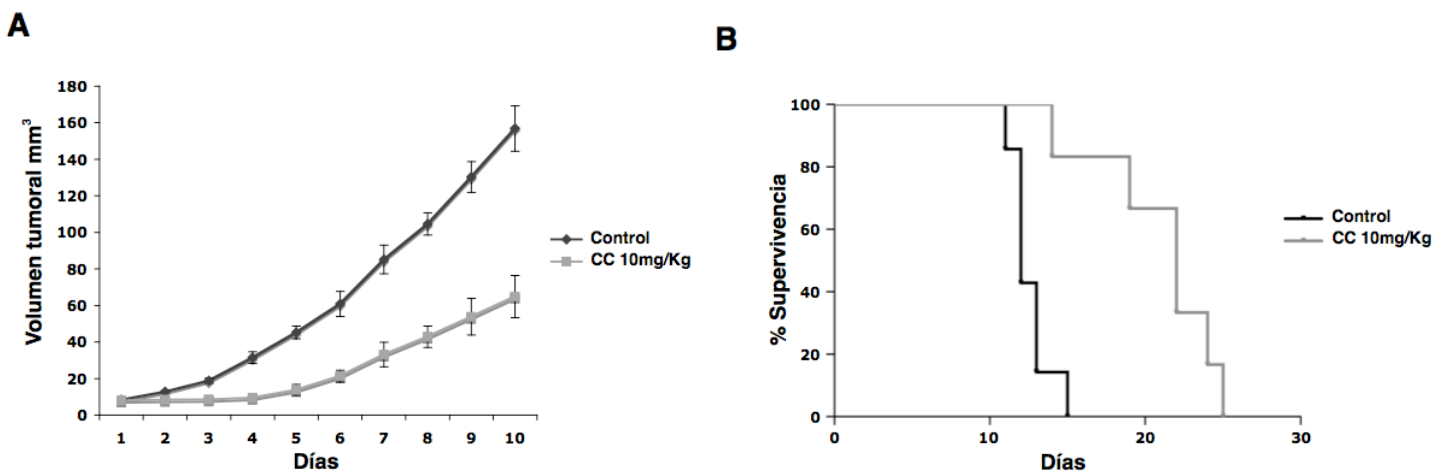


Figura 19: Efecto de compuesto C sobre crecimiento tumoral. Cuando los tumores derivados de la línea U87MG alcanzaron un tamaño de 10mm³ (día1) se trataron los ratones con compuesto C 10mg/Kg o con vehículo. **A.** Curva de crecimiento tumoral. Control (n=7), compuesto C (n=6). **B.** Tasa de supervivencia de los ratones tratados y no tratados con compuesto C. Control (n=7), compuesto C (n=6). Los resultados fueron analizados con Long-rank test (* p<0.0012 vs animales no tratados).

Cuando los tumores desarrollados por los ratones a partir de células de la línea U87MG alcanzaron un tamaño medible (10 mm³), se realizó una única inyección i.p. con

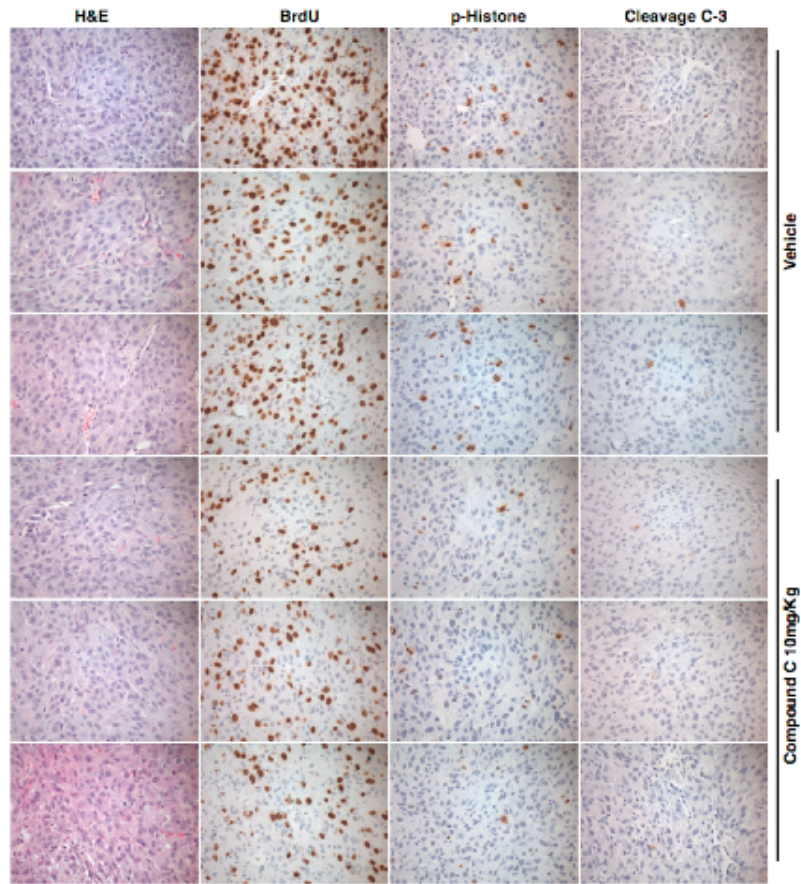
compuesto C (10mg/Kg) o vehiculo y se determinó diariamente el cambio de volumen de los tumores. Al igual que sucedió con los experimentos *in vitro*, el tratamiento con compuesto C disminuyó significativamente el crecimiento tumoral (Figura 19A). Además, la tasa de supervivencia, determinada mediante las curvas de Kaplan-Meier, mostró un incremento significativo cuando los ratones fueron tratados con compuesto C (Figura 19B). Estos datos indican que en el ambiente tumoral, la activación de AMPK es necesaria para mantener el crecimiento de gliomas.

3.4 El efecto de la inhibición de AMPK sobre la proliferación de gliomas de origen humano *in vivo* está mediado por Rb

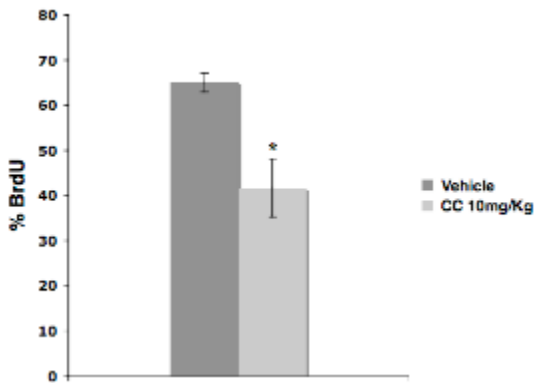
Para analizar si el mecanismo responsable del efecto del compuesto C sobre los gliomas *in vivo* era el mismo que el observado *in vitro*, determinamos los niveles de proliferación y apoptosis en muestras de los tumores desarrollados por los ratones. El tratamiento con compuesto C no produjo cambios en los niveles de caspasa-3 activa de los tumores (Figura 20A). Sin embargo, pudimos detectar una disminución significativa de los niveles de proliferación mediante detección por inmunohistoquímica de la incorporación de BrdU, así como por la reducción de los niveles de pHistona H3 (Figura 20A y B). Finalmente estudiamos el posible papel de la relación AMPK-Rb en la proliferación de los tumores tratados o no tratados con compuesto C. De acuerdo con nuestros resultados previos, la fosforilación de Rb disminuyó en paralelo con la reducción de la actividad de AMPK demostrada como pACC^{Ser79} en tumores de ratones que habían sido tratados con compuesto C (Figura 20C).

Por tanto, todos nuestros resultados muestran un importante papel de AMPK en la regulación del crecimiento celular inducido durante tumorigénesis, y que este efecto está mediado al menos en parte por la capacidad de AMPK para fosforilar a Rb.

A



B



C

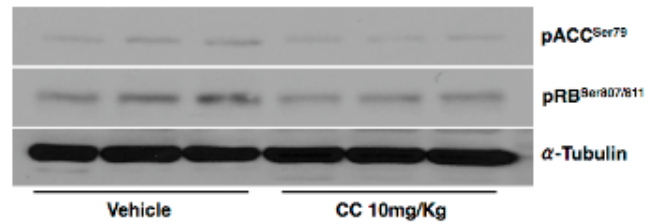


Figura 19: Efecto de compuesto C sobre proliferación en tumores gliales derivados de la línea U87MG. A. Inmunohistoquímica mostrando incorporación de BrdU, niveles de pHistona H3 y Caspasa-3 activa a los 8 días de haber sido tratados los ratones con compuesto C. **B.** Cuantificación de los niveles de incorporación de BrdU. Los datos fueron analizados con *t*-test * $p < 0,0001$ contra animales no tratados. **C.** Niveles de expresión de pACC, pRb^{Ser807/811} y α -Tubulin de muestras de tumores 8 días tras el tratamiento con compuesto C.

Discusión

Aunque Otto Warburg propuso hace 100 años una relación entre el metabolismo celular y la tumorigénesis^[1], los mecanismos celulares y moleculares involucrados en ella todavía no han sido esclarecidos. Una de las posibles uniones entre metabolismo y cáncer es AMPK. Este enzima es un sensor metabólico encontrado en todos los eucariotas que regula el metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas en respuesta a un cambio en la disponibilidad de nutrientes, diferentes tipos de estrés y regulación hormonal. Trabajos recientes han relacionado además AMPK con el crecimiento y la supervivencia celular, pero el papel de este enzima en cáncer es contradictorio. Así,

mientras en varios modelos de cáncer la señalización a través de AMPK aparece alterada y su activación se ha propuesto como una aproximación terapéutica^[344], otros trabajos han encontrado una activación de AMPK en tumores y su inhibición induce la reducción del crecimiento tumoral^[317-319]. Todo esto indica que el papel de AMPK en crecimiento y proliferación celular no está todavía claro. En este trabajo, hemos evaluado la regulación del metabolismo lipídico, la proliferación celular, y su posible interrelación con AMPK en un modelo de glioma murino con la activación de dos rutas de señalización (PI3K/AKT y Raf/MEK/ERK). Se eligieron estas dos vías de señalización puesto que ambas aparecen frecuentemente activadas en este tipo de tumores y se han relacionado con el metabolismo celular^[70, 102, 103]. Asimismo también hemos estudiado el papel de AMPK en tumores humanos utilizando para ello líneas celulares de glioma.

Como era esperado la sobreactivación de la vía de Raf/MEK/ERK indujo un aumento significativo en la proliferación celular. Sin embargo, la delección de *Pten* no tuvo prácticamente ningún efecto. Del mismo modo hemos podido observar efectos claros de la activación de la vía de Ras sobre AMPK y sobre metabolismo de lípidos, pero a lo largo de todo nuestro trabajo, la delección de *Pten* no produjo grandes efectos en ninguno de los parámetros que hemos estudiado.

1. Activación de AMPK

La ruta clásica de activación de AMPK implica una reducción en la disponibilidad de nutrientes y consiguiente reducción en los niveles de ATP celulares. En estas condiciones de depleción energética, AMPK inhibe las vías anabólicas y estimula las catabólicas para conseguir restablecer el balance energético y actúa como un supresor tumoral induciendo la parada del ciclo celular^[241, 242]. Nuestros resultados muestran elevados niveles de pAMPK inducidos por la activación de las rutas oncogénicas y éste es el primer trabajo donde se demuestra este efecto. Trabajos recientes han observado altos niveles de pAMPK en cáncer de próstata y glioma^[318, 319], pero en estos trabajos se ha hipotetizado que la activación de AMPK fue consecuencia de la hipoxia o isquemia del ambiente tumoral. Sin embargo en este trabajo nosotros mostramos que AMPK aparece activada en astrocitos con Ras oncogénico no sólo tras 7 días en cultivo sino

también 24 horas después de que el medio de cultivo fuera añadido a las células. Esto indica que la señalización oncogénica y no la hipoxia o la depleción de glucosa fue la responsable de esta activación en nuestro modelo. La activación de AMPK en ausencia de un estrés energético ya ha sido demostrada por otros autores. Así por ejemplo diversas hormonas, tales como leptina, adiponectina e interleukina-6, o las especies reactivas de oxígeno (ROS) activan AMPK^[349, 350]. Curiosamente estas adipokinas se han relacionado con en el desarrollo y progresión de algunos tipos de tumores^[351]. Estos datos parecen indicar la existencia de dos vías de activación de AMPK, una vía clásica que implica la depleción energética, y otra vía que se relaciona con rutas de señalización celular implicadas en metabolismo, proliferación y daño en DNA. En cualquier caso, AMPK actúa como un factor de supervivencia protegiendo a las células de distintos tipos de estrés incluyendo hipoxia y deprivación de nutrientes^[317, 352-355] inhibiendo rutas anabólicas tales como la transcripción de proteínas y la síntesis de ácidos grasos y colesterol, limitando de esta forma la utilización de ATP durante el estrés energético. Todo esto hace posible el crecimiento celular bajo condiciones extremas. La activación de AMPK mostrada por células que presentan Ras oncogénico podría constituir, entonces, una clara ventaja para ellas en el microambiente tumoral.

2. Metabolismo de lípidos y AMPK

En células de glioma, la glucólisis aparece frecuentemente incrementada y es la ruta más importante para obtener energía y macromoléculas en estas células^[49]. Uno de los destinos que puede seguir la glucosa es su conversión a lípidos, lo cual ocurre mediante la lipogénesis *de novo*. El objetivo es proporcionar un mayor aporte de lípidos a las células. Trabajos previos han mostrado que los niveles de FASN y la síntesis *de novo* de FA aparecen incrementados en un amplio rango de células tumorales, a pesar del aumento en consumo energético que esto conlleva^[176-188]. Además se ha propuesto que la sobreexpresión e hiperactividad de FASN juegan un importante papel en el mantenimiento del fenotipo agresivo en células tumorales^[312-315].

Menos conocido es el papel de los lípidos extracelulares en el metabolismo tumoral. Se ha observado que algunos tipos tumorales presentan una expresión incrementada de receptores de lipoproteínas tales como VLDLr o LDLr y a pesar de que no se ha llegado

a estudiar el papel de estos receptores en el metabolismo de las células tumorales, si se ha propuesto una implicación de ellos en la patogénesis del cáncer^[333-335].

2.1. Lipoproteínas y AMPK

Nuestros primeros experimentos mostraron que los eventos oncogénicos descritos desencadenaban en astrocitos una total dependencia de lípidos extracelulares. Concretamente, la incubación de estas células en medio sin lipoproteínas reducía el crecimiento celular en aquellos grupos experimentales que presentaban los eventos oncogénicos. La inhibición de la proliferación fue únicamente recuperada cuando se añadieron al medio de cultivo una combinación de al menos dos familias de lipoproteínas siendo necesaria la presencia de HDL en todas ellas.

En nuestro modelo la expresión de Ras oncogénico aumentó la expresión y los niveles proteicos de los receptores de lipoproteínas VLDLr, LDLr y ABCG1, implicados en el reconocimiento de VLDL, LDL, y HDL respectivamente. La funcionalidad de estos receptores era esencial para el crecimiento celular de los astrocitos con los eventos oncogénicos. De hecho el bloqueo del VLDLr con TFPIc23 redujo el crecimiento de las células con H-Ras^{V12} en un 30%, y el bloqueo conjunto de VLDLr y LDLr con RAP impidió prácticamente el efecto proliferativo de H-Ras^{V12}.

A diferencia de LDLr y ABCG1, VLDLr ha sido relacionado con proliferación y apoptosis. De esta forma y a parte de la función de VLDLr como un receptor de lipoproteínas, VLDLr puede activar rutas de señalización celular, tales como Ras y Akt^[356, 357]. De hecho trabajos previos han mostrado que TFPIc23 presenta una actividad anti-angiogénica y anti-tumoral inhibiendo la ruta de ERK inducida por VLDLr^[162]. Nuestros datos muestran que TFPIc23 reduce la proliferación inducida por oncogenes exclusivamente por inhibir la interacción entre VLDL y VLDLr, sin afectar a la señalización celular inducida por este receptor (vía Raf/MEK/ERK o PI3K/Akt). Todos estos datos ponen de manifiesto que los astrocitos con activación de la ruta Raf/MEK/ERK o PI3K/Akt necesitan grandes cantidades de lípidos extracelulares para poder proliferar y por lo tanto los receptores de lipoproteínas podrían ser considerados como posibles dianas terapéuticas en cáncer.

Trabajos recientes han demostrado que AMPK actúa en células hepáticas regulando la expresión de receptores de lipoproteínas y que su delección desencadena la reducción de los receptores^[358]. Este papel de AMPK podría interrelacionar los elevados niveles de AMPK activo con la sobreexpresión de los receptores de lipoproteínas que hemos observado en nuestras células, poniendo a AMPK como un punto de unión entre oncogénesis y dependencia de lípidos exógenos.

2.2. Síntesis de FA y AMPK

La expresión de Ras oncogénico así como la delección de *Pten* desencadenan un incremento de los niveles de FASN. Este incremento parece ser proporcional a los niveles de proliferación celular y probablemente estén mediados por el aumento de SREBP-1 el mayor factor implicado en la regulación de la expresión de FASN. Trabajos previos han mostrado que AMPK inhibe la expresión de FASN, el procesamiento de SREBP-1 y su actividad transcripcional^[359]. Sin embargo, en nuestro modelo la activación de AMPK inducida por la expresión de Ras oncogénico coexiste con altos niveles de FASN y SREBP-1, probablemente indicando un cambio en la especificidad de sustrato de AMPK o un papel predominante de Ras sobre SREBP-1^[102, 230]. Curiosamente ya se ha demostrado una coexistencia de altos niveles de FASN, SREBP-1 y AMPK en cáncer de próstata^[177, 319, 360].

A pesar del incremento de los niveles de FASN observados con la expresión de Ras oncogénico, la síntesis de FA determinada como actividad ACC-FASN no resultó incrementada, incluso cuando las células fueron cultivadas en LPDM. Este bajo nivel de actividad ACC-FASN se correlacionó con la inhibición de ACC por fosforilación debido a la activación de AMPK. Los niveles de pACC en células con expresión de Ras oncogénico se mantuvieron elevados incluso en medio con baja cantidad de lipoproteínas.

Datos de otros autores han demostrado en células tumorales una síntesis de lípidos incrementada debida a un aumento de la síntesis *de novo* de FA. En nuestros datos también se observa un incremento de la síntesis de lípidos en células con Ras oncogénico, determinada como incorporación de ¹⁴C en lípidos tras incubación de las células con ¹⁴C-glucosa, pero este incremento fue probablemente debido a la

modificación de lípidos tomados del medio de cultivo y no a un incremento de la síntesis *de novo* de FA, ya que el aumento en lípidos marcados en células con H-Ras^{V12} no se observaba cuando las células eran cultivadas en LPDM. Por tanto, aunque los hallazgos de altos niveles de FASN en células tumorales fue interpretado en ocasiones como un incremento del nivel de síntesis *de novo* de FA^[312, 340] nosotros mostramos que ambos eventos no siempre se correlacionan. Es razonable entonces proponer que, como se ha sugerido previamente^[361], la síntesis de FA puede no ser esencial para células con altos niveles de proliferación cuando una cantidad suficiente de lípidos extracelulares están presentes en su entorno. Ello indica que el origen de los lípidos empleados por las células tumorales puede variar dependiendo del estado de AMPK y esto debería ser tenido en consideración cuando se planteen nuevas dianas terapéuticas.

3. Proliferación, apoptosis y AMPK

En células epiteliales normales, AMPK es un potente inhibidor de la proliferación, y ha sido considerado como un supresor tumoral por su actividad como quinasa de p53 e inhibidor de la ruta de mTOR. Sin embargo su papel en la biología del cáncer todavía no se ha aclarado. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de AMPK como un inductor de proliferación en células gliales tumorales *in vitro* e *in vivo*, promoviendo la progresión del ciclo celular mediante la fosforilación de Rb. Trabajos recientes han observado altos niveles de pAMPK en cáncer de próstata y tumores gliales de rata^[318, 319], y la inhibición de AMPK en las células tumorales prostáticas reduce su nivel de proliferación, lo que apoya la idea de AMPK como inductor de proliferación en condiciones oncogénicas^[319]. En este trabajo nosotros hemos demostrado que a pesar de los altos niveles de pAMPK desencadenados por los eventos oncogénicos no tiene lugar una entrada de los astrocitos en apoptosis. El crecimiento celular se mantuvo aún en presencia de altos niveles de p53^[332 y no mostrado] y de la inhibición de la ruta de TSC2/mTOR.

3.1. Oncogénesis y AMPK nuclear

Uno de los puntos de regulación más importantes que pueden determinar el comportamiento de AMPK es su localización celular. Aunque AMPK puede encontrarse en el núcleo y en el citoplasma celular^[243], el mecanismo exacto que regula su distribución intracelular todavía no ha sido totalmente elucidado. Una localización en los diferentes compartimentos celulares sería crítico para dar una respuesta apropiada a estímulos intra y extracelulares, llevando a la fosforilación de distintas dianas, y por lo tanto a la regulación de diferentes funciones. En células de mamífero, la leptina^[263], el choque térmico y la densidad celular^[264] han sido propuestos como mecanismos que inducen la translocación de AMPK al núcleo. Además, también se ha demostrado que isoformas de AMPK se acumulan en el núcleo de forma circadiana^[362], y en células musculares AMPK se transloca al núcleo después del estrés provocado como consecuencia del ejercicio^[262]. En este trabajo nosotros mostramos que la localización nuclear de pAMPK se incrementó por la expresión de Ras oncogénico y/o la delección de *Pten*, indicando un papel de AMPK en el núcleo de estas células. Asimismo la expresión de H-Ras^{V12} desencadenó el incremento de los niveles de AMPK β 1 y una reducción de los niveles de AMPK β 2, lo cual refuerza la hipótesis de una importante función de AMPK a nivel nuclear, porque, como ya ha sido descrito, la localización nuclear de AMPK está relacionada con la expresión de la subunidad reguladora β 1^[299]. El aumento de la localización nuclear de AMPK a causa de la expresión de H-Ras^{V12} o delección de *Pten* podría tener importantes consecuencias funcionales. El efecto aparentemente más esperado sería un aumento de la fosforilación de sus sustratos nucleares. Así entre las dianas nucleares de AMPK se encuentran factores de transcripción tales como PGC1 α y PPAR γ ^[278, 364-366] (implicadas en la regulación del metabolismo), o la histona H2B^[367] (relacionada con ciclo celular). A parte de estos, recientemente se han atribuido otros papeles a la localización de AMPK en el núcleo, siendo el más importante su capacidad de fosforilar a Rb, lo que pone de manifiesto su papel en inducción del ciclo celular^[299].

3.2. Rb, AMPK y proliferación

Nuestros resultados indican que AMPK es un inductor de la proliferación celular en células de glioma murino y humano, y que uno de los mecanismos involucrados en esta función es su capacidad de fosforilar Rb.

En astrocitos de ratón la elevación de los niveles de pAMPK nuclear como consecuencia de los eventos oncogénicos se correlacionó con altos niveles de pRb^{Ser800/804}. Además la inhibición de AMPK con compuesto C redujo la incorporación de de BrdU e indujo una reducción de los niveles de pRb^{Ser800/804} tanto en astrocitos que expresaban H-Ras^{V12} como en líneas de glioma humano (U87MG y U373MG). Ya que se han descrito muchos efectos independientes de AMPK para el compuesto C^[346, 347], determinamos la posible función de esta molécula en proliferación utilizando astrocitos con delección de las subunidades catalíticas del enzima. Igual que sucedió con el compuesto C, la deleción de AMPK redujo significativamente el crecimiento y los niveles de pRb^{Ser800/804} de células que expresaban Ras oncogénico, sin que ello afectara al nivel de apoptosis o senescencia. Esto probablemente indica que los astrocitos normales cultivados en medio de cultivo completo (con abundantes nutrientes) no requieren AMPK para crecer. Sin embargo en las células que expresan H-Ras^{V12}, la activación de AMPK es esencial para su crecimiento, para poder regular el metabolismo celular e inducir la fosforilación de Rb. Este papel fundamental de AMPK en el crecimiento celular inducido por oncogenes fue observado no sólo en modelos de ratón, sino también en las dos líneas de glioma utilizadas en este trabajo. Así, el bloqueo de la expresión de AMPK con siRNA redujo significativamente la capacidad proliferativa de ambas líneas.

Finalmente, pudimos demostrar que una sola dosis de compuesto C reduce significativamente el crecimiento en ratones SCID de tumores formados a partir de la línea U87MG, incrementándose la supervivencia de los animales tratados. Una vez más cuando estudiamos los mecanismos moleculares involucrados en este efecto, pudimos demostrar niveles reducidos de pRb^{Ser800/804} y niveles reducidos de proliferación.

En conclusión, en células normales AMPK es activado por diferentes tipos de estrés incluyendo privación de nutrientes o bajos niveles de O₂ e induce supervivencia celular por adaptaciones metabólicas y parada de crecimiento. Sin embargo situaciones

oncogénicas, tales como la presencia de H-Ras^{v12}, activa AMPK el cual promueve el crecimiento celular por inhibir rutas que consumen ATP y por fosforilar Rb.

Este estudio ha pretendido arrojar luz sobre la regulación del metabolismo celular durante el proceso de iniciación de astrocitomas/glioblastomas.. La identificación de AMPK como importante regulador no sólo del metabolismo celular de lípidos, sino también del ciclo celular implica una aproximación terapéutica presentando a AMPK como una posible diana farmacológica en el tratamiento de pacientes con astrocitomas/glioblastomas con elevados niveles de pAMPK.

Conclusiones

La expresión de H-Ras^{V12} en astrocitos de ratón desencadena la activación de AMPK e induce una dependencia de los lípidos extracelulares.

La activación de AMPK en un contexto oncogénico favorece el crecimiento celular actuando por lo menos a dos niveles: reduce el gasto energético con la inhibición de rutas anabólicas (como la síntesis *de novo* de FA, o la vía de TSC2/mTOR) y promueve el ciclo celular fosforilando a Rb y favoreciendo la proliferación.

Tanto el bloqueo de receptores de lipoproteínas como la inhibición de AMPK podrían constituir buenas dianas terapéuticas para el tratamiento de tumores gliales con altos niveles de pAMPK.

Conclusions

H-Ras^{v12} expression in mice astrocytes increases extracellular lipid dependence and AMPK activity in order to allow tumour growth.

AMPK activation by oncogenic events reduces energy expenditure by inhibiting *de novo* FA synthesis and the TSC2/mTOR pathway, and induces Rb phosphorylation, playing a crucial role in glioma cell growth.

AMPK antagonists and lipoprotein receptor inhibitors could potentially be used as glioma treatments.

Bibliografia

1. Warburg O., Wind F., Negelein E. 1927. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 8: 519-30.

2. Mankoff DA, Shields AF, Krohn KA. 2005. PET imaging of cellular proliferation. *Radiol Clin North Am.* 43: 153–67.

3. Muzi M, Vesselle H, Grierson JR, Mankoff DA, Schmidt RA, Peterson L, Wells JM, Krohn KA. 2005. Kinetic analysis of 3'-deoxy-3'-fluorothymidine PET studies: validation studies in patients with lung cancer. *J Nucl Med.* 46: 274–82.

4. Stokkel MP, ten Broek FW, van Rijk PP. 1998. The role of FDG PET in the clinical management of head and neck cancer. *Oral Oncol.*34: 466–71.

5. Guido Kroemer and Jacques Pouyssegur. 2008. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell.* 13: 472-82.

6. Reuben J Shaw. 2006. Glucose metabolism and cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 18: 598–608

7. Nasmyth K. 2002. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science*. 297: 559-65.
8. Musacchio A, Salmon ED. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8: 379-93.
9. Mitchison JM. 2003. Growth during the cell cycle. *Int Rev Cytol*. 226: 165-258.
10. Jorgensen P, Tyers M. 2004. How cells coordinate growth and division. *Curr Biol*. 14: 1014-27.
11. Sherr CJ 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677
12. Grana X & Reddy EP 1995. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11: 211-219).
13. Graña X, Garriga J, Mayol X. 1998. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene*. 17: 3365-83.
14. Bosco, E.E., and Knudsen, E.S. 2007. Rb in breast cancer: At the crossroads of tumorigenesis and treatment. *Cell Cycle* 6: 667-671.
15. Johnson, D.G., and DeGregori, J. 2006. Putting the oncogenic and tumor suppressive activities of E2F into context. *Curr. Mol. Med.* 6: 731-738.
16. Weinberg RA 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330
17. Attwooll, C., Denchi, E.L., and Helin, K. 2004. The E2F family: Specific functions and overlapping interests. *EMBO J*. 23: 4709-4716
18. Christensen, J., Cloos, P., Toftegaard, U., Klinkenberg, D., Bracken, A.P., Trinh, E., Heeran, M., Di Stefano, L., and Helin, K. 2005. Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell cycle regulated repressor of E2F activated transcription. *Nucleic Acids Res*. 33: 5458-5470
19. Sherr CJ. 1996. Cancer cell cycles. *Science*. 274: 1672-7.
20. Lundberg AS, Weinberg RA. 1998. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*. 18: 753-61.
21. Knudsen ES, Wang JY. 1996. Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites. *J Biol Chem*. 271: 8313-20.
22. Hunter T., Pines J 1994. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79: 573-582. glucose in liver cells.
23. Rubin E, Mittnacht S, Villa-Moruzzi E, Ludlow JW. 2001. Site-specific and temporally-regulated retinoblastoma protein dephosphorylation by protein phosphatase type 1. *Oncogene*. 20: 3776-85.
24. Helin K, Harlow E, Fattaey A. 1993. Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*. 13: 6501-8.

25. Adnane J, Shao Z, Robbins PD. The retinoblastoma susceptibility gene product represses transcription when directly bound to the promoter. *J Biol Chem.* 1995 Apr 14;270(15):8837-43.
26. Weintraub SJ, Chow KN, Luo RX, Zhang SH, He S, Dean DC. 1995. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature.* 375: 812-5.
27. Luo RX, Postigo AA, Dean DC. 1998. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell.* 92: 463-73.
28. Lukas J, Müller H, Bartkova J, Spitkovsky D, Kjerulff AA, Jansen-Dürr P, Strauss M, Bartek J. 1994. DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. *J Cell Biol.* 125: 625-38.
29. Felsani A, Mileo AM, Paggi MG. 2006. Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene.* 25: 5277-85.
30. Deléhouzée S, Yoshikawa T, Sawa C, Sawada J, Ito T, Omori M, Wada T, Yamaguchi Y, Kabe Y, Handa H. 2005. GABP, HCF-1 and YY1 are involved in Rb gene expression during myogenesis. *Genes Cells.* 10: 717-31.
31. Carreira S, Goodall J, Aksan I, La Rocca SA, Galibert MD, Denat L, Larue L, Goding CR. 2005. Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature.* 433: 764-9.
32. Iavarone A, King ER, Dai XM, Leone G, Stanley ER, Lasorella A. 2004. Retinoblastoma promotes definitive erythropoiesis by repressing Id2 in fetal liver macrophages. *Nature.* 432: 1040-5.
33. Nguyen DX, Baglia LA, Huang SM, Baker CM, McCance DJ. 2004. Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *EMBO J.* 23: 1609-18.
34. Wong S, Weber JD. 2007. Deacetylation of the retinoblastoma tumour suppressor protein by SIRT1. *Biochem J.* 407: 451-60.
35. Ahuja, D., Saenz-Robles, M.T., and Pipas, J.M. 2005. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* 24: 7729–7745.
36. Berk, A.J. 2005. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene* 24: 7673–7685.
37. O'Shea, C.C. 2005. DNA tumor viruses - the spies who lyse us. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15: 18–26.
38. de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.-Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Lowe, S.W. 1998. E1A signaling to p53 involves the p19ARF tumor suppressor. *Genes Dev.* 12: 2434–2442

39. Wu, X., and Levine, A.J. 1994. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3602–3606.
40. Hallstrom, T.C., and Nevins, J.R. 2003. Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad.* 100: 10848-53.
41. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 282: 1318-21.
42. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 91: 231-41.
43. del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nuñez G. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*. 278: 687-9.
44. Kozma SC, Thomas G. 2002. Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K. *Bioessays*. 24: 65-71.
45. Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN, Niwa-Kawakita M, Sweet-Cordero A, Sebolt-Leopold J, Shannon KM, Settleman J, Giovannini M, Jacks T. 2008. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet*. 40: 600-8.
46. Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG. 1994. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science*. 265: 966-70.
47. Plas DR, Thompson CB. 2005. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 24: 7435-42.
48. Jones RG, Thompson CB. 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23: 537-48.
49. Shaw RJ, Cantley LC. 2006. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441: 424-30.
50. Fan Y, Dickman KG, Zong WX. 2010. Akt and c-Myc differentially activate cellular metabolic programs and prime cells to bioenergetic inhibition. *J Biol Chem*. 285: 7324-33.
51. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, Kalyanaraman B, Mutlu GM, Budinger GR, Chandel NS. 2010. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 8788-93.
52. Scheid M.P., Woodgett J.R. 2001. PKB/AKT: functional insights from genetic models, *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 2: 760–768
53. Gonzalez E, McGraw TE. 2009. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 8: 2502-8.

54. Dillon RL, Muller WJ. 2010. Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res* 70: 4260-4.
55. Hollander MC, Maier CR, Hobbs EA, Ashmore AR, Linnoila RI, Dennis PA. 2011. Akt1 deletion prevents lung tumorigenesis by mutant K-ras. *Oncogene* 30: 1812-21.
56. Chau NM, Ashcroft M. 2004. Akt2: a role in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 6: 55-7
57. Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR. 2002. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol* 22: 6247-6260.
58. Yang J, Cron P, Thompson V, Good VM, Hess D, Hemmings BA, Barford D. 2002. Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol Cell* 9: 1227-1240.
59. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-1101.
60. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, Sabatini DM. 2006. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* 16: 1865-1870.
61. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B. 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127: 125-137.
62. Pearce L R, Huang X, Boudeau J, Pawlowski R, Wullschleger S, Deak M, Ibrahim AF, Gurlay R, Magnuson MA, Alessi DR. 2007. Identification of pitor as a novel rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J* 405: 513-522.
63. Woo SY, Kim DH, Jun CB, Kim YM, Haar EV, Lee SI, Hegg JW, Bandhakavi S, Griffin TJ. 2007. PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J Biol Chem* 282: 25604-25612.
64. Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, Lamba S, Cardone L, Rodolfo M, Scarpa A, Leenstra S, Frattini M, Barbareschi M, Grammasio MD, Sciarrotta MG, Zanon C, Marchetti A, Bardelli A. 2008. AKT1(E17K) in human solid tumours. *Oncogene*. 27: 5648-50.
65. Sulis, M.L. and Parsons, R. 2003. PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol*. 13: 478-483.
66. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. 1998. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95:29-39.
67. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. 1997. PTEN, a putative protein

tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275: 1943-7.

68. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. 1997. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.* 15: 356–362.

69. Li DM, Sun H. 1997. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* 57: 2124-9.

70. Ohgaki H, Kleihues P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 170: 1445-53.

71. Maehama T, Taylor GS, Dixon JE. 2001. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem.* 70: 247-79

72. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 7: 606-19.

73. Maehama T, Dixon JE. 1998 The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 273: 13375-8.

74. Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH,

Downes CP, Tonks NK. 1998. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 13513-8.

75. Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, Benchimol S, Mak TW. 2001. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell.* 8: 317-325

76. Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, Caparros E, Buteau J, Brown K, Perkins SL, Bhagat G, Agarwal AM, Basso G, Castillo M, Nagase S, Cordon-Cardo C, Parsons R, Zúñiga-Pflücker JC, Dominguez M, Ferrando AA. 2007. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med.* 13: 1203-1210

77. Vasudevan KM, Gurumurthy S, Rangnekar VM. 2004. Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol.* 24: 1007-1021

78. Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, Sohn-Lee C, le Sage C, Agami R, Tuschl T, Holland EC. 2009. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis *in vivo*. *Genes Dev.* 23: 1327-37.

79. Wang X, Jiang X. 2008. Post-translational regulation of PTEN. *Oncogene.* 27: 5454-63.

80. Kwon CH, Zhao D, Chen J, Alcantara S, Li Y, Burns DK, Mason RP, Lee EY, Wu H, Parada LF. 2008. Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas. *Cancer Res.* 68: 3286-94.

81. He L, Hou X, Kanel G, Zeng N, Galicia V, Wang Y, Yang J, Wu H, Birnbaum MJ, Stiles BL. 2010. The critical role of AKT2 in hepatic steatosis induced by PTEN loss. *Am J Pathol.* 176: 2302-8.
82. Cheng X, Ma Y, Moore M, Hemmings BA, Taylor SS. 1998. Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 9849-54
83. Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. 1998. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science.* 281: 2042-5
84. Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A. 1998. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol.* 8: 1069-77
85. Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA. 1999. Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J.* 18: 3024-33.
86. Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G. 1998. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science.* 279: 707-10.
87. Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J. 1998. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase *in vivo* and *in vitro*. *Curr Biol.* 8: 69-81.
88. Richards SA, Fu J, Romanelli A, Shimamura A, Blenis J. 1999. Ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) activation requires signals dependent on and independent of the MAP kinase ERK. *Curr Biol.* 9: 810-20.
89. Weng L, Brown J, Eng C. 2001. TEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways. *Hum Mol Genet.* 10: 237-42.
90. Chang CJ, Freeman DJ, Wu H. 2004. PTEN regulates Mdm2 expression through the P1 promoter. *J Biol Chem.* 279: 29841-8.
91. Freeman DJ, Li AG, Wei G, Li HH, Kertesz N, Lesche R, Whale AD, Martinez-Diaz H, Rozengurt N, Cardiff RD, Liu X, Wu H. 2003. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell.* 3: 117-30.
92. Li AG, Piluso LG, Cai X, Wei G, Sellers WR, Liu X. 2006. Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN. *Mol Cell.* 23: 575-87.
93. Gu J, Tamura M, Yamada KM. 1998. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol.* 143: 1375-83.
94. Gu J, Tamura M, Pankov R, Danen EH, Takino T, Matsumoto K, Yamada KM. 1999.

Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol.* 146: 389-403.

95. Tamura M, Gu J, Takino T, Yamada KM. 1999. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res.* 59: 442-9.

96. Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG. 1994. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science.* 265: 966-70.

97. Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. 1994. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell.* 77: 841-52

98. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 270: 1326-31.

99. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimmual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. 2000. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science.* 288: 870-4.

100. Besson A, Yong VW. 2001. Mitogenic signaling and the relationship to cell cycle regulation in astrocytomas. *J Neurooncol.* 51: 245-64.

101. Oxford G, Theodorescu D. 2003. Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility. *Cancer Lett.* 189: 117-28.

102. Kotzka J, Müller-Wieland D, Roth G, Kremer L, Munck M, Schürmann S, Knebel B, Krone W. 2000. Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade. *J Lipid Res.* 41: 99-108.

103. Ramanathan A, Wang C, Schreiber SL. 2005. Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 5992-7

104. Reuther GW, Der CJ. 2000. The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol.* 12: 157-65.

105. Pruitt K, Der CJ. 2001. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett.* 171: 1-10.

106. Sahai E, Marshall CJ. 2002. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2: 133-42

107. Randazzo PA, Inoue H, Bharti S. 2007. Arf GAPs as regulators of the actin cytoskeleton. *Biol Cell.* 99: 583-600.

108. Pfeffer SR. 2001. Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function, *Trends Cell Biol.* 11: 487-491.

109. Kuersten S, Ohno M, Mattaj IW. 2001. Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol.* 11: 497-503.

110. Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C. 1991. The ras protein family: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry*. 30: 4637–4648.
111. Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ. 2000. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol*. 10: 147-54.
112. Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF. 1998. RAS isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*. 273: 24052–6.
113. Liebmann C. 2001. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signaling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal*. 13: 777–85.
114. Ross PJ, George M, Cunningham D, DiStefano F, Andreyev HJ, Workman P, Clarke PA. 2001. Inhibition of Kirsten RAS expression in human colorectal cancer using rationally selected Kirsten-RAS antisense oligonucleotides. *Mol Cancer Ther*. 1: 29–41.
115. Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN, Niwa-Kawakita M, Sweet-Cordero A, Sebolt-Leopold J, Shannon KM, Settleman J, Giovannini M, Jacks T. 2008. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet*. 40: 600-8.
116. Adjei AA. 2001. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 93: 1062-74.
117. Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S. 1990. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*. 3:198 –208.
118. Carruthers A. 1990. Facilitated diffusion of glucose. *Physiol Rev*. 70: 1135-76
119. Joost HG, Thorens B. 2001. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol Membr Biol*. 18: 247–256.
120. Fukumoto H, Seino S, Imura H, Seino Y, Eddy RL, Fukushima Y, Byers MG, Shows TB, Bell GI. 1988. Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85: 5434 – 5438.
121. Fukumoto H, Kayano T, Buse JB, Edwards Y, Pilch PF, Bell GI, Seino S. 1989. Cloning and characterization of the major transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J Biol Chem*. 264: 7776 –7779.
122. Wu X, Freeze. 2002. GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *HH Genomics*. 80: 553-7.
123. Boado RJ, Black KL, Pardridge WM. 1994. Gene expression of GLUT3 and GLUT1 glucose transporters in human brain tumors. *Brain Res Mol Brain Res*. 27: 51-7.

124. Nishioka T, Oda Y, Seino Y, Yamamoto T, Inagaki N, Yano H, Imura H, Shigemoto R, Kikuchi H. 1992. Distribution of the glucose transporters in human brain tumors. *Cancer Res.* 52: 3972-9.
125. Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, Yamada Y, Inoue K, Manabe T, Imura H. 1990. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 170: 223-30.
126. Nagamatsu S, Sawa H, Wakizaka A, Hoshino T. 1993. Expression of facilitative glucose transporter isoforms in human brain tumors. *J Neurochem.* 61: 2048-53.
127. Brown RS, Wahl RL. 1993. Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study. *Cancer.* 72: 2979-85.
128. Nagase Y, Takata K, Moriyama N, Aso Y, Murakami T, Hirano H. 1995. Immunohistochemical localization of glucose transporters in human renal cell carcinoma. *J Urol.* 153: 798-801
129. Baer SC, Casaubon L, Younes M. 1997. Expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in cutaneous neoplasia. *J Am Acad Dermatol.* 37: 575-7.
130. Ogawa J, Inoue H, Koide S. 1997. Glucose-transporter-type-I-gene amplification correlates with sialyl-Lewis-X synthesis and proliferation in lung cancer. *Int J Cancer.* 74: 189-92.
131. Haber RS, Rathan A, Weiser KR, Pritsker A, Itzkowitz SH, Bodian C, Slater G, Weiss A, Burstein DE. 1998. GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis. *Cancer.* 83: 34-40.
132. Wang BY, Kalir T, Sabo E, Sherman DE, Cohen C, Burstein DE. 2000. Immunohistochemical staining of GLUT1 in benign, hyperplastic, and malignant endometrial epithelia. *Cancer.* 88: 2774-81.
133. Cantuaria G, Fagotti A, Ferrandina G, Magalhaes A, Nadji M, Angioli R, Penalver M, Mancuso S, Scambia G. 2001. GLUT-1 expression in ovarian carcinoma: association with survival and response to chemotherapy. *Cancer.* 92: 1144-50.
134. Rudlowski C, Becker AJ, Schroder W, Rath W, Büttner R, Moser M. 2003. GLUT1 messenger RNA and protein induction relates to the malignant transformation of cervical cancer. *Am J Clin Pathol.* 120: 691-8.
135. Dutu R, Nedelea M, Veluda G, Burculeț V. 1980. Cytoenzymologic investigations on carcinomas of the cervix uteri. *Acta Cytol.* 24: 160-6.
136. Board M, Humm S, Newsholme EA. 1990. Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. *Biochem J.* 265: 503-9.
137. Ikezaki K, Black KL, Conklin SG, Becker DP. 1992. Histochemical evaluation of

- energy metabolism in rat glioma. *Neurol Res.* 14: 289-93.
138. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. 2006. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9: 425–434.
139. Altenberg, B. & Greulich, K. O. 2004. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84: 1014–1020 .
140. Majewski N, Nogueira V, Robey RB, Hay N. 2004. Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Mol Cell Biol.* 24: 730-40.
141. Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. 2002. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem.* 277: 7610-8.
142. Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM, Thompson CB. 2003. Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol.* 23: 7315-28.
143. Zheng L, Roeder RG, Luo Y. 2003. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell.* 114: 150-2.
144. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. 2004. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 64: 3892-3899.
145. Yamada E, Okada S, Saito T, Ohshima K, Sato M, Tsuchiya T, Uehara Y, Shimizu H, Mori M. 2005. Akt2 phosphorylates Synip to regulate docking and fusion of GLUT4-containing vesicles. *J Cell Biol.* 168: 921-8.
146. Barthel A, Okino ST, Liao J, Nakatani K, Li J, Whitlock JP Jr, Roth RA. 1999. Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *J Biol Chem.* 274: 20281-6.
147. Wieman HL, Wofford JA, Rathmell JC. 2007. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol Biol Cell.* 18: 1437-46.
148. Zhou QL, Jiang ZY, Holik J, Chawla A, Hagan GN, Leszyk J, Czech MP. 2008. Akt substrate TBC1D1 regulates GLUT1 expression through the mTOR pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J.* 411: 647-55.
149. Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Dürr P, Eigenbrodt E. 2001. Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene.* 20: 6891-8
150. Semenza G. 2002. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol.* 64: 993-8.
151. Zhou J, Brüne B. 2006. Cytokines and hormones in the regulation of hypoxia inducible

factor-1alpha (HIF-1alpha). *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 4: 189-97.

152. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. 2000. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 14: 391-6.

153. Murakami T, Nishiyama T, Shirotani T, Shinohara Y, Kan M, Ishii K, Kanai F, Nakazuru S, Ebina Y. 1992. Identification of two enhancer elements in the gene encoding the type 1 glucose transporter from the mouse which are responsive to serum, growth factor, and oncogenes. *J Biol Chem.* 267: 9300-6.

154. Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. 1995. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem.* 270: 29083-9.

155. Flier JS, Mueckler MM, Usher P, Lodish HF. 1987. Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science.* 235: 1492-5.

156. Birnbaum MJ, Haspel HC, Rosen OM. 1987. Transformation of rat fibroblasts by FSV rapidly increases glucose transporter gene transcription. *Science.* 235: 1495-8.

157. Racker E, Resnick RJ, Feldman R. 1985. Glycolysis and methylaminoisobutyrate uptake in rat-1 cells transfected with ras or myc oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82: 3535-8

158. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. 2001. Regulation of GLUT1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem.* 276: 9519-25.

159. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. 2006. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer.* 93: E73-80.

160. Medes G., Thomas A., Weinhouse S. 1953. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices *in vitro*. *Cancer Res.* 13: 27-9.

161. Vance, Dennis E., Vance, Jean E., ed. *lit. Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranas.* Elsevier, 2002. ISBN 0-444-51138-5

162. Di Y, Liu Z, Tian J, Zong Y, Yang P, Qu S. 2010. TFPI or uPA-PAI-1 complex affect cell function through expression variation of type II very low density lipoprotein receptor. *FEBS Lett.* 584: 3469-73.

163. May P, Herz J, Bock HH. 2005. Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling. *Cell Mol Life Sci.* 62: 2325-2338.

164. Jeon H, Blacklow SC. 2005. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem.* 74: 535-562.

165. Dean M, Hamon Y, Chimini G. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC)

- transporter superfamily. *J. Lipid Res.* 42: 1007–1017
166. de La Llera-Moya M, Connelly MA, Drazul D, Klein SM, Favari E, Yancey PG, Williams DL, Rothblat GH. 2001. Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. *J. Lipid Res.* 42: 1969–1978.
167. Yancey PG, de la Llera-Moya M, Swarnakar S, Monzo P, Klein SM, Connelly MA, Johnson WJ, Williams DL, Rothblat GH. 2000. High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J. Biol. Chem.* 275: 36596–36604
168. Abu-Elheiga L, Almarza-Ortega DB, Baldini A, Wakil SJ. 1997. Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. *J Biol Chem.* 272: 10669-77.
169. Abu-Elheiga L, Jayakumar A, Baldini A, Chirala SS, Wakil SJ. 1995. Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 4011-5.
170. Ha J, Lee JK, Kim KS, Witters LA, Kim KH. 1996. Cloning of human acetyl-CoA carboxylase-beta and its unique features. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 11466-70.
171. Iverson AJ, Bianchi A, Nordlund AC, Witters LA. 1990. Immunological analysis of acetyl-CoA carboxylase mass, tissue distribution and subunit composition. *Biochem J.* 269: 365-71.
172. McGarry JD, Leatherman GF, Foster DW. 1978. Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. *J Biol Chem.* 253: 4128-36.
173. Tanabe T, Wada K, Okazaki T, Numa S. 1975. Acetyl-coenzyme-A carboxylase from rat liver. Subunit structure and proteolytic modification. *Eur J Biochem.* 57: 15-24.
174. Al-Feel W, Chirala SS, Wakil SJ. 1992. Cloning of the yeast FAS3 gene and primary structure of yeast acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 4534-8.
175. Hasslacher M, Ivessa AS, Paltauf F, Kohlwein SD. 1993. Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *J Biol Chem.* 268: 10946-52.
176. Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP. 1997. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in situ breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 3: 2115-20.
177. Epstein JI, Carmichael M, Partin AW. 1995. OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. *Urology.* 45: 81-6.
178. Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, Pasternack GR,

- Kuhajda FP, Hamilton SR. 1997. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol.* 150: 201-8.
179. Gansler TS, Hardman W 3rd, Hunt DA, Schaffel S, Hennigar RA. 1997. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Hum Pathol.* 28: 686-92.
180. Pizer ES, Lax SF, Kuhajda FP, Pasternack GR, Kurman RJ. 1998. Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma: correlation with cell proliferation and hormone receptors. *Cancer.* 83: 528-37.
181. Gabrielson EW, Pinn ML, Testa JR, Kuhajda FP. 2001. Increased fatty acid synthase is a therapeutic target in mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 7: 153-7.
182. Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimbarger DC, Grizzle WE. 2000. The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol.* 31: 1068-73.
183. Sekiguchi M, Shiroko Y, Arai T, Kishino T, Sugawara I, Kusakabe T, Suzuki T, Yamashita T, Obara T, Ito K, Hasumi K. 2001. Biological characteristics and chemosensitivity profile of four human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Biomed Pharmacother.* 55: 466-74.
184. Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. 2002. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology.* 40: 71-9.
185. Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE, Grizzle WE. 1999. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck.* 21: 325-9.
186. Nemoto T, Terashima S, Kogure M, Hoshino Y, Kusakabe T, Suzuki T, Gotoh M. 2001. Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal squamous cell dysplasia and carcinoma. *Pathobiology.* 69: 297-303.
187. Camassei FD, Jenkner A, Ravà L, Bosman C, Francalanci P, Donfrancesco A, Alò PL, Boldrini R. 2003. Expression of the lipogenic enzyme fatty acid synthase (FAS) as a predictor of poor outcome in nephroblastoma: an interinstitutional study. *Med Pediatr Oncol.* 40: 302-8.
188. Zhao W, Kridel S, Thorburn A, Kooshki M, Little J, Hebbar S, Robbins M. 2006. Fatty acid synthase: a novel target for anti glioma therapy. *Br J Cancer.* 95: 869-78.
189. Coleman RA, Lee DP. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res.* 43: 134-76.
190. Hajra AK. 1995. Glycerolipid biosynthesis in peroxisomes (microbodies). *Prog Lipid Res.* 34: 343-64.
191. Cao J, Li JL, Li D, Tobin JF, Gimeno RE. 2006. Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in *de novo*

- triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 19695-700.
192. Lewin TM, Granger DA, Kim JH, Coleman RA. 2001. Regulation of mitochondrial sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity: response to feeding status is unique in various rat tissues and is discordant with protein expression. *Arch Biochem Biophys*. 396: 119-27.
193. Lewin TM, Schwerbrock NM, Lee DP, Coleman RA. 2004. Identification of a new glycerol-3-phosphate acyltransferase isoenzyme, mtGPAT2, in mitochondria. *J Biol Chem*. 279: 13488-95.
194. Nagle CA, Vergnes L, Dejong H, Wang S, Lewin TM, Reue K, Coleman RA. 2008. Identification of a novel sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase isoform, GPAT4, as the enzyme deficient in *Agpat6*^{-/-} mice. *J Lipid Res*. 49: 823-31.
195. Chen YQ, Kuo MS, Li S, Bui HH, Peake DA, Sanders PE, Thibodeaux SJ, Chu S, Qian YW, Zhao Y, Bredt DS, Moller DE, Konrad RJ, Beigneux AP, Young SG, Cao G. 2008. AGPAT6 is a novel microsomal glycerol-3-phosphate acyltransferase. *J Biol Chem*. 283: 10048-57.
196. Paulauskis JD, Sul HS. 1988. Cloning and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. Developmental and hormonal regulation in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*. 263: 7049-54.
197. Shin DH, Paulauskis JD, Moustaid N, Sul HS. 1991. Transcriptional regulation of p90 with sequence homology to *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate acyltransferase. *J Biol Chem*. 266: 23834-9.
198. Onorato TM, Haldar D. 2002. Casein kinase II stimulates rat liver mitochondrial glycerophosphate acyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 296: 1091-6.
199. Onorato TM, Chakraborty S, Haldar D. 2005. Phosphorylation of rat liver mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase by casein kinase 2. *J Biol Chem*. 280: 19527-34.
200. Muoio DM, Seefeld K, Witters LA, Coleman RA. 1999. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J*. 338: 783-91.
201. Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, Saha AK. 2002. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem*. 277: 32571-7.
202. Harvey BE, Crain RC. 1987. Biosynthesis of glycerolipids by hepatoma and liver microsomes. I. Fatty acyl-CoA ligase and acyl-CoA:sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochim Biophys Acta*. 917: 247-57.
203. Agarwal AK, Garg A. 2010. Enzymatic activity of the human 1-acylglycerol-

- 3-phosphate-O-acyltransferase isoform 11: upregulated in breast and cervical cancers. *J Lipid Res.* 51: 2143-52.
204. Kerner J, Hoppel C. 2000. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1486: 1-17.
205. Grum DE, Hansen LR, Drackley JK. 1994. Peroxisomal beta-oxidation of fatty acids in bovine and rat liver. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 109: 281-92.
206. Simpson AE. 1997. The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *Gen Pharmacol.* 28: 351-9.
207. Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW, McGarry JD. 1993. Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J Biol Chem.* 268: 5817-22.
208. Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, McGarry JD. 1996. Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *J Biol Chem.* 271: 6972-7.
209. López-Viñas E, Bentebibel A, Gurunathan C, Morillas M, de Arriaga D, Serra D, Asins G, Hegardt FG, Gómez-Puertas P. 2007. Definition by functional and structural analysis of two malonyl-CoA sites in carnitine palmitoyltransferase 1A. *J Biol Chem.* 282: 18212-24.
210. Price N, van der Leij F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, Zammit V. 2002. A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics.* 80: 433-42.
211. Sierra AY, Gratacós E, Carrasco P, Clotet J, Ureña J, Serra D, Asins G, Hegardt FG, Casals N. 2008. CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem.* 283: 6878-85.
212. Paumen MB, Ishida Y, Muramatsu M, Yamamoto M, Honjo T. 1997. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 272: 3324-9.
213. Nuñez G, Clarke MF. 1994. The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biol.* 4: 399-403.
214. Mazzarelli P, Pucci S, Bonanno E, Sesti F, Calvani M, Spagnoli LG. 2007. Carnitine palmitoyltransferase I in human carcinomas: a novel role in histone deacetylation? *Cancer Biol Ther.* 6: 1606-13.
215. Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 86: 839-48.
216. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS. 1993. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-

leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*. 75: 187-97.

217. Brown AJ, Sun L, Feramisco JD, Brown MS, Goldstein JL. 2002. Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol Cell*. 10: 237-45.

218. Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS. 2002. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*. 110: 489-500.

219. Sun LP, Li L, Goldstein JL, Brown MS. 2005. Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins *in vitro*. *J Biol Chem*. 280: 26483-90.

220. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leevers S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A. 2008. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab*. 8: 224-36.

221. Li C, Kraemer FB, Ahlborn TE, Liu J. 1999. Induction of low density lipoprotein receptor (LDLR) transcription by oncostatin M is mediated by the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway and the repeat 3 element of the LDLR promoter. *J Biol Chem*. 274: 6747-53.

222. Rakhshandehroo M, Hooiveld G, Müller M, Kersten S. 2009. Comparative analysis of gene regulation by the transcription

factor PPARalpha between mouse and human. *PLoS One*. 4: e6796.

223. Rakhshandehroo M, Sanderson LM, Matilainen M, Stienstra R, Carlberg C, de Groot PJ, Müller M, Kersten S. 2007. Comprehensive Analysis of PPARalpha-Dependent Regulation of Hepatic Lipid Metabolism by Expression Profiling. *PPAR Res*. 2007: 26839.

224. Kotokorpi P, Ellis E, Parini P, Nilsson LM, Strom S, Steffensen KR, Gustafsson JA, Mode A. 2007. Physiological differences between human and rat primary hepatocytes in response to liver X receptor activation by 3-[3-[N-(2-chloro-3-trifluoromethylbenzyl)-(2,2-diphenylethyl) amino] propoxy] phenyl acetic acid hydrochloride (GW3965). *Mol Pharmacol*. 72: 947-55.

225. Huwait EA, Greenow KR, Singh NN, Ramji DP. 2010. A novel role for c-Jun N-terminal kinase and phosphoinositide 3-kinase in the liver-X-receptors-mediated induction of macrophage gene expression. *Cell Signal*. 23: 542-9.

226. Tarr PT, Edwards PA. 2008. ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2. *J Lipid Res*. 49: 169-82.

227. Chao F, Gong W, Zheng Y, Li Y, Huang G, Gao M, Li J, Kuruba R, Gao X, Li S, He F. 2010. Upregulation of scavenger receptor class B type I expression by activation of FXR in hepatocyte. *Atherosclerosis*. Oct 16. 213: 443-8.

228. Lopez D, McLean MP. 1999. Sterol regulatory element-binding protein-1a binds to cis elements in the promoter of the rat high density lipoprotein receptor SR-BI gene. *Endocrinology*. 140: 5669-81.
229. Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. 1999. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem*. 274: 35832-9.
230. Kotzka J, Lehr S, Roth G, Avci H, Knebel B, Muller-Wieland D. 2004. Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 *in vivo*. *J Biol Chem*. 279: 22404-11.
231. Ericsson J, Jackson SM, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA. 1997. Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *J Biol Chem*. 272: 7298-305.
232. Dentin R, Denechaud PD, Benhamed F, Girard J, Postic C. 2006. Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J Nutr*. 136: 1145-9.
233. Jansen MS, Cook GA, Song S, Park EA. 2000. Thyroid hormone regulates carnitine palmitoyltransferase Ialpha gene expression through elements in the promoter and first intron. *J Biol Chem*. 275: 34989-97.
234. Zhang Y, Ma K, Song S, Elam MB, Cook GA, Park EA. 2004. Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 alpha) enhances the thyroid hormone induction of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I alpha). *J Biol Chem*. 279: 53963-71.
235. Sadana P, Zhang Y, Song S, Cook GA, Elam MB, Park EA. 2007. Regulation of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-Ialpha) gene expression by the peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator (PGC-1) isoforms. *Mol Cell Endocrinol*. 267: 6-16.
236. Miranda-Saavedra D, Stark MJ, Packer JC, Vivares CP, Doerig C, Barton GJ. 2007. The complement of protein kinases of the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi* in relation to those of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC Genomics*. 8: 309.
237. Lee JH, Koh H, Kim M, Kim Y, Lee SY, Karess RE, Lee SH, Shong M, Kim JM, Kim J, Chung J. 2007. Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature*. 447: 1017-20.
238. Mirouse V, Swick LL, Kazgan N, St Johnston D, Brenman JE. 2007. LKB1 and AMPK maintain epithelial cell polarity under energetic stress. *J Cell Biol*. 177: 387-92.
239. Hardie DG, Carling D, Carlson M. 1998. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem*. 67: 821-55.

240. Thelander M, Olsson T, Ronne H. 2004. Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle. *EMBO J.* 23: 1900-10.
241. Mu J, Barton ER, Birnbaum MJ. 2003. Selective suppression of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: update on 'lazy mice'. *Biochem Soc Trans.* 31: 236-41.
242. Nilsson EC, Long YC, Martinsson S, Glund S, Garcia-Roves P, Svensson LT, Andersson L, Zierath JR, Mahlapuu M. 2006. Opposite transcriptional regulation in skeletal muscle of AMP-activated protein kinase gamma3 R225Q transgenic versus knock-out mice. *J Biol Chem.* 281: 7244-52.
243. Salt I, Celler JW, Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D, Hardie DG. 1998. AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem J.* 334: 177-87.
244. Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. 2000. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J.* 346: 659-69.
245. Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D. 2000. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J.* 345: 437-43.
246. Crute BE, Seefeld K, Gamble J, Kemp BE, Witters LA. 1998. Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 273: 35347-54.
247. Chen L, Jiao ZH, Zheng LS, Zhang YY, Xie ST, Wang ZX, Wu JW. 2009. Structural insight into the autoinhibition mechanism of AMP-activated protein kinase. *Nature.* 459: 1146-9.
248. McBride A, Hardie DG. 2009. AMP-activated protein kinase--a sensor of glycogen as well as AMP and ATP? *Acta Physiol (Oxf).* 196: 99-113.
249. Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. 2007. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature.* 449: 496-500.
250. Hardie DG. 1999. Roles of the AMP-activated/SNF1 protein kinase family in the response to cellular stress. *Biochem Soc Symp.* 64: 13-27.
251. Scott JW, Ross FA, Liu JK, Hardie DG. 2007. Regulation of AMP-activated protein kinase by a pseudosubstrate sequence on the gamma subunit. *EMBO J.* 26: 806-15.
252. Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D. 2006. Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 28: 32207-16.
253. Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D. 2007. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J.* 403: 139-48.

254. Lizcano JM, Göransson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau J, Hawley SA, Udd L, Mäkelä TP, Hardie DG, Alessi DR. 2004. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 23: 833-43.
255. Sakamoto K, McCarthy A, Smith D, Green KA, Grahame Hardie D, Ashworth A, Alessi DR. 2005. Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J.* 24: 1810-20.
256. Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D. 2005. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* 2: 21-33.
257. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG. 2005. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2: 9-19.
258. Momcilovic M, Hong SP, Carlson M. 2006. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase *in vitro*. *J Biol Chem.* 281: 25336-43.
259. Xie M, Zhang D, Dyck JR, Li Y, Zhang H, Morishima M, Mann DL, Taffet GE, Baldini A, Khoury DS, Schneider MD. 2006. A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 17378-83.
260. Herrero-Martín G, Høyer-Hansen M, García-García C, Fumarola C, Farkas T, López-Rivas A, Jäättelä M. 2009. TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *EMBO J.* 28: 677-85.
261. Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, Andrikopoulos S, Proietto J, Görgün CZ, Carling D, Hotamisligil GS, Febbraio MA, Kay TW, Kemp BE. 2006. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab.* 4: 465-74.
262. Lo WS, Duggan L, Emre NC, Belotserkovskaya R, Lane WS, Shiekhhattar R, Berger SL. 2001. Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science.* 293: 1142-6.
263. McGee SL, Howlett KF, Starkie RL, Cameron-Smith D, Kemp BE, Hargreaves M. 2003. Exercise increases nuclear AMPK alpha2 in human skeletal muscle. *Diabetes.* 52: 926-8.
264. Suzuki A, Okamoto S, Lee S, Saito K, Shiuchi T, Minokoshi Y. 2007. Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the alpha2 form of AMP-activated protein kinase. *Mol Cell Biol.* 27: 4317-27.

265. Kodiha M, Rassi JG, Brown CM, Stochaj U. 2007. Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK-->ERK1/2 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293: C1427-36.
266. Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF. 1999. Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J Neurochem.* 72: 1707-16.
267. Warden SM, Richardson C, O'Donnell J Jr, Stapleton D, Kemp BE, Witters LA. 2001. Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem J.* 354: 275-83.
268. Mitchelhill KI, Michell BJ, House CM, Stapleton D, Dyck J, Gamble J, Ullrich C, Witters LA, Kemp BE. 1997. Posttranslational modifications of the 5'-AMP-activated protein kinase beta1 subunit. *J Biol Chem.* 272: 24475-9.
269. Thomson DM, Herway ST, Fillmore N, Kim H, Brown JD, Barrow JR, Winder WW. 2008. AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J Appl Physiol.* 104: 429-38.
270. Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 12017-22.
271. Yang W, Hong YH, Shen XQ, Frankowski C, Camp HS, Leff T. 2001. Regulation of transcription by AMP-activated protein kinase: phosphorylation of p300 blocks its interaction with nuclear receptors. *J Biol Chem.* 276: 38341-4.
272. Barish GD, Narkar VA, Evans RM. 2006. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 116: 590-7.
273. Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K. 2002. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 277: 3829-35.
274. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. 2003. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* 546: 113-20.
275. Holmes BF, Sparling DP, Olson AL, Winder WW, Dohm GL. 2005. Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 289 :E1071-6.
276. Sreaton RA, Conkright MD, Katoh Y, Best JL, Canettieri G, Jeffries S, Guzman E, Niessen S, Yates JR 3rd, Takemori H, Okamoto M, Montminy M. 2004. The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell.* 119: 61-74.
277. Jørgensen SB, Treebak JT, Viollet B, Schjerling P, Vaulont S, Wojtaszewski JF, Richter EA. 2007. Role of AMPKalpha2 in basal, training-, and AICAR-induced GLUT4,

- hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292: E331-9.
278. Leff T. 2003. AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem Soc Trans.* 31: 224-7
279. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. 2000. Surfing the p53 network. *Nature.* 408: 307-10.
290. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. 2005. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 18: 283-93.
291. Imamura K, Ogura T, Kishimoto A, Kaminishi M, Esumi H. 2001. Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 287: 562-7.
292. Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC. 2004 The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell.* 6: 91-9.
293. Mirouse V, Swick LL, Kazgan N, St Johnston D, Brenman JE. 2007. LKB1 and AMPK maintain epithelial cell polarity under energetic stress. *J Cell Biol.* 177: 387-92.
294. Lee JH, Koh H, Kim M, Kim Y, Lee SY, Karess RE, Lee SH, Shong M, Kim JM, Kim J, Chung J. 2007. Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature.* 447: 1017-20.
295. Vazquez-Martin A, López-Bonet E, Oliveras-Ferreros C, Pérez-Martínez MC, Bernadó L, Menendez JA. 2009. Mitotic kinase dynamics of the active form of AMPK (phospho-AMPKalphaThr172) in human cancer cells. *Cell Cycle.* 8: 788-91.
296. Downs SM, Ya R, Davis CC. 2010. Role of AMPK throughout meiotic maturation in the mouse oocyte: evidence for promotion of polar body formation and suppression of premature activation. *Mol Reprod Dev.* 77: 888-99.
297. Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL, Slingerland JM, Mills GB. 2007. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol.* 9: 218-24.
298. Zhao J, Yue W, Zhu MJ, Sreejayan N, Du M. 2010. AMP-activated protein kinase (AMPK) cross-talks with canonical Wnt signaling via phosphorylation of beta-catenin at Ser 552. *Biochem Biophys Res Commun.* 395: 146-51.
299. Dasgupta B, Milbrandt J. 2009. AMP-activated protein kinase phosphorylates retinoblastoma protein to control mammalian brain development. *Dev Cell.* 16: 256-70.

300. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. 2001. Negative control of p53 by Sir2 α promotes cell survival under stress. *Cell*. 107: 137–148.
301. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. 2001. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*. 107: 149–159.
302. Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T. 2002. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J*. 21: 2383–2396
303. Fulco M, Sartorelli V. 2008. Comparing and contrasting the roles of AMPK and SIRT1 in metabolic tissues. *Cell Cycle*. 7: 3669-79.
304. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. 2009. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 458: 1056-60.
305. Luo Z, Saha AK, Xiang X, Ruderman NB. 2005. AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 26: 69–76.
306. Tiainen M, Ylikorkala A, Mäkelä TP. 1999. Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 9248-51.
307. Ikediobi ON, et al. 2006. Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Mol Cancer Ther*. 5: 2606–2612.
308. Ji H, et al. 2007. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature*. 448: 807–810.
309. Su GH, Hruban RH, Bansal RK, Bova GS, Tang DJ, Shekher MC, Westerman AM, Entius MM, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE. 1999. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am J Pathol*. 154: 1835–1840.
310. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL. 2006. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*. 126: 955–968.
311. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 30: 214–226.
312. Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. 2004. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem*. 91: 47–53.
313. Kuhajda FP. 2000. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*. 16: 202–208.

314. De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. 2003. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 63: 3799–3804
315. Thupari JN, Pinn ML, Kuhajda FP. 2001. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 285: 217–223.
316. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. 2005. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 18: 283–293.
317. Laderoute KR, Amin K, Calaoagan JM, Knapp M, Le T, Orduna J, Foretz M, Viollet B. 2006. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol.* 26: 5336-47.
318. Jang T, Calaoagan JM, Kwon E, Samuelsson S, Recht L, Laderoute KR. 2011. 5'-AMP-activated protein kinase activity is elevated early during primary brain tumor development in the rat. *Int J Cancer.* 128: 2230-9.
319. Park HU, Suy S, Danner M, Dailey V, Zhang Y, Li H, Hyduke DR, Collins BT, Gagnon G, Kallakury B, Kumar D, Brown ML, Fornace A, Dritschilo A, Collins SP. 2009. AMP-activated protein kinase promotes human prostate cancer cell growth and survival. *Mol Cancer Ther.* 8: 733-41.
320. Viollet B, Andreelli F, Jørgensen SB, Perrin C, Geloën A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M, Gomas E, Nicolas G, Wojtaszewski JF, Kahn A, Carling D, Schuit FC, Birnbaum MJ, Richter EA, Burcelin R, Vaulont S. 2003. The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest.* 111: 91-8.
321. Lesche R, Groszer M, Gao J, Wang Y, Messing A, Sun H, Liu X, Wu H. 2002. Cre/loxP-mediated inactivation of the murine Pten tumor suppressor gene. *Genesis.* 32: 148-9.
322. McCarthy KD, de Vellis J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 85: 890-902.
323. Swift S., Lorens J., Achacoso, P. and Nolan, G.P. 1999. Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Current Protocols in Immunology.* Unit 10.28, Suppl. 31.
324. Sayer JA, Carr G, Simmons NL. 2004. Calcium phosphate and calcium oxalate crystal handling is dependent upon CLC-5 expression in mouse collecting duct cells. *Biochim Biophys Acta.* 1689: 83-90.
325. Gillies RJ, Didier N, Denton M. 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 159: 109-13.
326. Dimri GP, et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture

- and in aging skin *in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A. 92: 9363-7.
327. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-54.
328. Nepokroeff CM, Lakshmanan MR, Porter JW. 1975. Fatty-acid synthase from rat liver. Methods Enzymol. 35: 37-44.
329. Seethala R, Ma Z, Golla R, Cheng D. (2006). A homogeneous scintillation proximity assay for acetyl coenzyme A carboxylase coupled to fatty acid synthase. Anal Biochem 358, 257-65.
330. Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 37: 911-7.
331. Li L, Dutra A, Pak E, Labrie JE 3rd, Gerstein RM, Pandolfi PP, Recht LD, Ross AH. 2009. EGFRvIII expression and PTEN loss synergistically induce chromosomal instability and glial tumors. Neuro Oncol. 11: 9-21.
332. Seoane M, Iglesias P, Gonzalez T, Dominguez F, Fraga M, Aliste C, Forteza J, Costoya JA. 2008. Retinoblastoma loss modulates DNA damage response favoring tumor progression. PLoS One. 3: e3632.
333. Luo M, Liu YJ, Xia LM, Yan W, Zhu Q, Tian DA. 2010. Very low density lipoprotein receptor subtype II silencing by RNA interference inhibits cell proliferation in hepatoma cell lines. Hepatogastroenterology. 57: 882-90.
334. Chen Y, Hughes-Fulford M. 2001. Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. Int J Cancer. 91: 41-5.
335. Montel V, Gaultier A, Lester RD, Campana WM, Gonias SL. 2007. The low-density lipoprotein receptor-related protein regulates cancer cell survival and metastasis development. Cancer Res. 67: 9817-24.
336. Williams SE, Ashcom JD, Argraves WS, Strickland DK. 1992. A novel mechanism for controlling the activity of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. J Biol Chem. 267: 9035-9040.
337. Battey FD, Gåfvæls ME, FitzGerald DJ, Argraves WS, Chappell DA, Strauss JF 3rd, Strickland DK. 1994. The 39-kDa receptor-associated protein regulates ligand binding by the very low density lipoprotein receptor. J Biol Chem. 269: 23268-23273.
338. Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M. 2010. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. Future Oncol. 6: 551-62.
339. Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW. 2004. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. Cancer Res. 64: 2070-5.

340. Menendez JA, Lupu R. 2007. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 7: 763-77.
341. An Z, Wang H, Song P, Zhang M, Geng X, Zou MH. 2007. Nicotine-induced activation of AMP-activated protein kinase inhibits fatty acid synthase in 3T3L1 adipocytes: a role for oxidant stress. *J Biol Chem*. 282: 26793-801.
342. Kim KH. 1997. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr*. 17: 77-99.
343. Davies SP, Sim AT, Hardie DG. 1990. Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. *Eur J Biochem*. 187: 183-90.
344. Fogarty S, Hardie DG. (2010). Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1804: 581-91.
345. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. 1995. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*. 229: 558-65.
346. Emerling BM, Viollet B, Tormos KV, Chandel NS. 2007. Compound C inhibits hypoxic activation of HIF-1 independent of AMPK. *FEBS Lett*. 581: 5727-31.
347. Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, Lin HY, Bloch KD, Peterson RT. 2008. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*. 4: 33-41.
348. Li Y, Guessous F, Kwon S, Kumar M, Ibidapo O, Fuller L, Johnson E, Lal B, Hussaini I, Bao Y, Laterra J, Schiff D, Abounader R. 2008. PTEN has tumor-promoting properties in the setting of gain-of-function p53 mutations. *Cancer Res*. 68: 1723-31.
349. Alexander A, Walker CL. 2010. Differential localization of ATM is correlated with activation of distinct downstream signaling pathways. *Cell Cycle*. 9: 3685-6.
350. Kola B, Boscaro M, Rutter GA, Grossman AB, Korbonits M. 2006. Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab*. 17: 205-15.
351. Mistry T, Digby JE, Desai KM, Randeva HS. 2007. Obesity and prostate cancer: a role for adipokines. *Eur Urol*. 52: 46-53.
352. Culmsee C, Monnig J, Kemp BE, Mattson MP. 2001. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci*. 17: 45-58.
353. Hashimoto K, Kato K, Imamura K, Kishimoto A, Yoshikawa H, Taketani Y, Esumi H. 2002. 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside confers strong tolerance to glucose starvation in a 5'-AMP-activated protein kinase-dependent fashion. *Biochem Biophys Res Commun*. 290: 263-7.

354. Kato K, Ogura T, Kishimoto A, Minegishi Y, Nakajima N, Miyazaki M, Esumi H. 2002. Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation. *Oncogene*. 21: 6082-90.
355. Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.L. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 115: 577-590.
356. D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T. 1999. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*. 24: 471-9.
357. Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J. 1999. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*. 24: 481-9.
358. Foretz M, Ancellin N, Andreelli F, Saintillan Y, Grondin P, Kahn A, Thorens B, Vaulont S, Viollet B. 2005. Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes*. 54: 1331-9.
359. Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, Gao B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Shaw RJ, Cohen RA, Zang M. 2011. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab*. 13: 376-88.
360. Ettinger SL, Sobel R, Whitmore TG, Akbari M, Bradley DR, Gleave ME, Nelson CC. 2004. Dysregulation of sterol response element-binding proteins and downstream effectors in prostate cancer during progression to androgen independence. *Cancer Res*. 64: 2212-21.
361. Chajès V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM, Joulin V. 2006. Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res*. 66: 5287-94.
362. Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, Evans RM. 2009. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science*. 326: 437-40.
363. Bronner M, Hertz R, Bar-Tana J. 2004. Kinase-independent transcriptional co-activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by AMP-activated protein kinase. *Biochem J*. 384: 295-305.
364. Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 12017-22.
365. Narkar VA, Downes M, Yu RT, Embler E, Wang YX, Banayo E, Mihaylova MM, Nelson MC, Zou Y, Juguilon H, Kang H, Shaw RJ, Evans RM. 2008. AMPK and

PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell*. 134: 405-15.

366. Bungard D, Fuerth BJ, Zeng PY, Faubert B, Maas NL, Viollet B, Carling D, Thompson CB, Jones RG, Berger SL. 2010. Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation. *Science*. 329: 1201-5.

“Hasta aquí llegan los caminos y los días”

Gary Jennings
“Aztec”