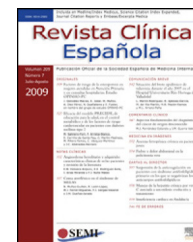




Revista Clínica Española

www.elsevier.es/rce



ARTÍCULO ESPECIAL

I Lección Magistral Andrés Laguna. Metabolismo de la división celular: descubrimiento y perspectivas[☆]

1st Andrés Laguna Master Lecture. Metabolism of cell division: Discovery and perspectives

Sir Salvador Moncada

University College of London, Londres, Reino Unido

Recibido el 4 de junio de 2013; aceptado el 5 de junio de 2013
Disponible en Internet el 25 de julio de 2013

Lección Magistral Andrés Laguna

Es para mí un gran honor y un placer haber sido invitado para pronunciar esta primera Lección Magistral Andrés Laguna con motivo de la celebración de la vida y obra de este distinguido médico y erudito español que vivió en la primera mitad del siglo xvi. Además de médico, este viajero y poeta también se formó y graduó como botánico, político, diplomático, humanista y lingüista, como tan elegantemente se describe en la obra «Vida y obra del doctor Andrés Laguna»¹. A través de los años, mis propios intereses de investigación han sido los fármacos parecidos a la aspirina, las prostaciclina, el óxido nítrico y, más recientemente, lo que constituirá el tema de la presente conferencia: la proliferación celular.

Como continuación de nuestro trabajo sobre el efecto inhibidor del óxido nítrico sobre la respiración mitocondrial, y en colaboración con Juan Bolaños y Ángeles Almeida, observamos que los astrocitos, y no así las neuronas, responden a la inhibición de la respiración con un aumento de su metabolismo glucolítico. Además, utilizan el ATP generado por vía glicolítica para mantener su potencial de membrana mitocondrial y, por tanto, su viabilidad². Estudios posteriores demostraron que, tras la inhibición de la respiración, a diferencia de las neuronas,

los astrocitos presentan un aumento de la actividad de la 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB). Esta enzima genera fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6P2), un potente activador alostérico de la 6-fosfofructo-1-cinasa (PFK1), un regulador clave de la glucólisis. El silenciamiento de la PFKFB suprimió la capacidad de los astrocitos de sobre-regular la glucólisis en respuesta a la inhibición de la respiración. Más aun, mediante el uso de la estrategia del RNA interferente pequeño (siRNA), hemos demostrado que la inhibición de la respiración da lugar a un cambio en la proporción de AMP a ATP, y la consiguiente fosforilación (activación) de la proteincinasa activada por AMP (AMPK). Como resultado se produce la activación de la PFKFB, se eleva la regulación de la glucólisis y la protección de las células frente a la apoptosis³ (fig. 1). Por consiguiente, la ausencia virtual de PFKFB en las neuronas puede explicar su extrema sensibilidad al agotamiento de la energía y la degeneración.

Tras estos hallazgos, descubrimos que la PFKFB3 (la isoforma específica presente en los astrocitos), a diferencia de otras isoformas de PFKFB, contiene una caja KEN que comienza en la posición 142⁴. Este hecho señala a las proteínas para su ubiquitinación por el complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C), la E3 ubiquitina ligasa, cuando esta se une a su activador Cdh1⁵. Hemos demostrado que la PFKFB3 de las neuronas está constantemente sometida a degradación proteasomal por la acción del APC/C-Cdh1. Esto explica por qué la proteína PFKFB3 está ausente en las neuronas a pesar del hecho de que las mismas expresan su ácido ribonucleico mensajero (mRNA); también explica

[☆] Con motivo de la I Lección Magistral Andrés Laguna. Parainfó de la Universidad de Alcalá. 18 de octubre de 2012.

Correo electrónico: j_a_gutierrez@network.lilly.com

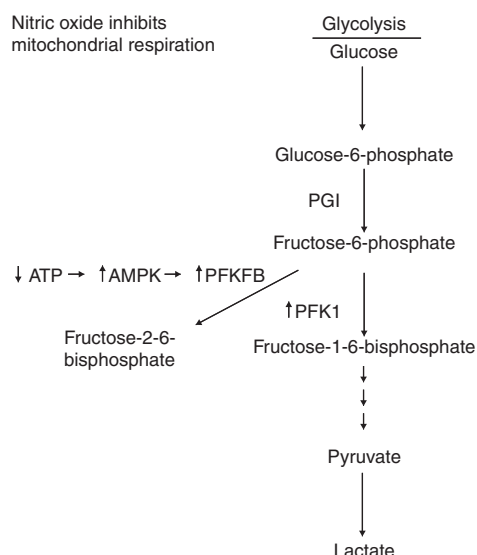


Figura 1 Metabolismo de la glucosa en los astrocitos. Tras la inhibición de la respiración mitocondrial por medio de óxido nítrico se produce una disminución de la concentración de ATP y la consiguiente fosforilación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). Esto da lugar a la activación de la 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB) y a una mayor generación de fructosa-2,6-bisfosfato que da como resultado la sobre-regulación de la glucólisis mediada por 6-fosfofructo-1-cinasa (PFK1).

por qué en estas células no se produce la sobre-regulación de la glucólisis⁴. Así mismo, encontramos que las neuronas utilizan la glucosa para producir el glutatión antioxidante mediante la vía de las pentosas fosfato. Por tanto, mediante la activa disminución de la regulación de la glucólisis por el APC/C-Cdh1, las neuronas utilizan la glucosa para mantener su estado antioxidante a expensas de su utilización para fines bioenergéticos⁴.

El APC/C desempeña un papel esencial en la proliferación celular mediante la degradación de proteínas del ciclo celular. Cuando se combina con su activador Cdc20, regula las proteínas responsables de la transición entre la meta-fase y la anafase, mientras que en combinación con Cdh1 es responsable de la destrucción de las ciclinas en la fase G1 temprana del ciclo. Para que se produzca el inicio de la fase S, durante la cual tiene lugar la replicación cromosómica, es precisa la inactivación del APC/C-Cdh1 en un punto crítico en G1, conocido como punto de restricción (R). Se sabe que el punto de restricción es sensible tanto a los factores de crecimiento como a los nutrientes⁶. El hecho de que la PFKFB3 sea un sustrato para el APC/C-Cdh1 nos ha llevado a demostrar que su degradación por medio de la ubiquitina ligasa podría ser parte integrante de la fase G1 del ciclo celular, y que un aumento de la PFKFB3 tras la disminución del APC/C-Cdh1 que se produce en la fase G1 media-tardía podría ser el mecanismo de coordinación del suministro de glucosa con todos los otros pasos necesarios para la progresión a la fase S⁷.

Posteriormente, nuestra investigación demostró en 2 tipos celulares diferentes (células neoplásicas y no neoplásicas) que mediante la sobre-expresión de Cdh1 se impiden tanto la proliferación celular como la glucólisis, mientras

que las mismas se potencian por medio de su silenciamiento. Además, utilizando una forma de PFKFB3 con una mutación en su caja KEN, que la hace resistente a la ubiquitinación por APC/C-Cdh1, demostramos que, aunque la glucólisis es esencial para la proliferación celular, la glucólisis por sí misma, en presencia de altas concentraciones de Cdh1, no da lugar a la proliferación celular⁸. Estos resultados fueron confirmados en linfocitos T humanos en proliferación⁹, con lo que queda demostrado que el mecanismo implicado en este proceso es el mismo para la proliferación de las células normales recién aisladas y no es un fenómeno limitado a determinadas líneas celulares, ya sean cancerosas o normales. Estos estudios también establecieron que, al igual que las ciclinas, la actividad de la PFKFB3 durante el ciclo celular depende de 2 etapas. Para la primera es necesaria la expresión del gen y la consiguiente síntesis de la proteína, procesos ambos que tienen lugar en fases tempranas. La enzima generada de este modo se ubiquitina continuamente hasta que es activada cuando disminuye el APC/C-Cdh1 durante la fase G1 media-tardía.

La glutamina, a través de su conversión a glutamato y posterior procesamiento en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), es un colaborador fundamental de la glucosa en la proliferación celular^{10,11}. La primera etapa de la glutaminólisis –la conversión de la glutamina en glutamato junto con la generación de amoníaco a partir del grupo amido del sustrato– tiene como enzima catalizadora a la glutaminasa (GLS), cuyas 2 isoformas contienen las cajas KEN. Este antecedente nos llevó a buscar e identificar a la GLS como diana para el APC/C-Cdh1⁹. Encontramos que la forma más abundante en los linfocitos humanos en proliferación es la GLS1, la isoforma que está más frecuentemente asociada con las células cancerosas en proliferación¹². Nuestros experimentos con linfocitos en proliferación mostraron que la acumulación de GLS1 tenía lugar a medida que disminuía el APC/C-Cdh1 y coincidía con un aumento de la utilización de glutamina, así como con el aumento de la glucólisis. Por lo tanto, la disminución de la actividad del APC/C-Cdh1 no solo libera PFKFB3 para activar la glucólisis de manera alostérica mediante la síntesis de fructosa 2,6-bisfosfato, sino también GLS1 para activar la glutaminólisis (fig. 2). Esto explica el aumento simultáneo en la utilización de ambos sustratos durante la proliferación celular como ya se comunicó hace muchos años¹¹. La sobreexpresión de Cdh1 disminuyó tanto la respuesta proliferativa como la utilización de glutamina: la sobreexpresión concomitante de una forma de GLS1 mutada, que ya no era un sustrato para APC/C-Cdh1, restauró la producción de amoníaco, pero no la respuesta proliferativa⁹. También encontramos que, aunque la GLS1 es ubiquitinada por APC/C-Cdh1, difiere de la PFKFB3 en que para su reconocimiento por esta ubiquitina ligasa es necesaria la presencia de una caja KEN y una caja D, en lugar de solo una caja KEN¹³.

Con el objeto de correlacionar con mayor precisión la aparición de estas enzimas metabólicas con una etapa específica de la proliferación celular, decidimos utilizar células que habían sido sincronizadas mediante procedimientos estandarizados. De este modo, hemos correlacionado la presencia de la PFKFB3 y la GLS1 con la progresión del ciclo celular en células HeLa tratadas tanto con bloqueo doble con timidina (DTB) como con DTB más nocodazol para su sincronización en el límite de G1/S o G2/M,

Control metabólico de la proliferación celular

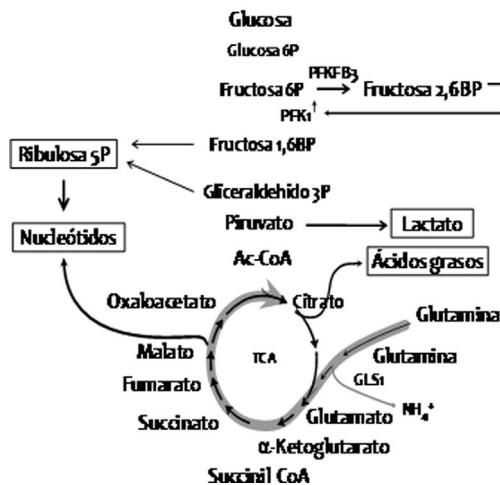


Figura 2 Control metabólico de la proliferación celular. Tanto la 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB3), como la glutaminasa 1 (GLS1) están reguladas por el complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C), una ubiquitina ligasa, cuando está unido a su activador Cdh1. Una disminución de la actividad del APC/C-Cdh1 libera ambas enzimas, para que la PFKFB3 pueda sobreregular la glucólisis y la GLS1 pueda activar la glutaminólisis. De este modo, ambas vías metabólicas están coordinadas con el ciclo celular.

respectivamente. Encontramos que los niveles de la proteína PFKFB3, que inicialmente estaban por debajo del límite de detección, incrementaron bruscamente en la fase G1 media-tardía, tras la desaparición de Cdh1. Este pico de PFKFB3 tuvo una duración breve, de solo 2 a 4 h y se correlacionó con la generación incrementada transitoria de lactato^{13,14}. Se demostró que la desaparición de PFKFB3 después de la transición de G1 a S, en un momento en el que el APC/C-Cdh1 ya no era activo, era debida a la acción del complejo SCF- β -TrCP¹⁴. Encontramos que la PFKFB3 también contiene un sitio de consenso para el reconocimiento de la proteína β -TrCP (el motivo DSGXXS) y que la Ser²⁷³ es el resto específico cuya fosforilación es necesaria para el reconocimiento de la proteína por la ubiquitina ligasa^{13,14} al inicio de la fase S. Por consiguiente, la presencia de PFKFB3 está firmemente controlada para asegurar la sobreregulación por incremento de la glucólisis en un punto específico de la fase G1. En contraste, el uso de células HeLa sincronizadas demostró que la GLS1 no es un sustrato para SCF- β -TrCP y que no se degrada hasta el final de la mitosis, momento en el que el APC/C-Cdh1 vuelve a activarse. La utilización de glutamina en esos experimentos se correlacionó con el aumento de la proteína GLS1 en la fase G1 media-tardía, y permaneció elevada hasta que la GLS1 fue degradada por el APC/C-Cdh1¹³. La regulación postraslacional opuesta de PFKFB3 y GLS1, que hemos verificado por medio de estudios de ubiquitinación y estabilidad proteica¹³, sugiere que la glucólisis y la glutaminólisis desempeñan papeles diferentes en distintas etapas del ciclo celular.

Nuestros estudios demuestran que la actividad de algunas enzimas metabólicas cruciales «fluctúa» durante el ciclo celular de manera parecida a la de las ciclinas¹⁵. Queda por ver si otras proteínas con motivos de reconocimiento de

consenso para APC/C-Cdh1 y SCF- β -TrCP fluctúan de manera parecida. La dilucidación de las etapas posteriores a la disminución de la actividad del APC/C-Cdh1 tiene ahora gran interés, ya que la progresión a través de G1 no solo es un punto central para la coordinación de la progresión del ciclo celular con el metabolismo, sino también un sitio en el que aparece un alto grado de desregulación durante la transformación neoplásica¹⁶. La cuidadosa comparación entre células normales y células cancerosas en proliferación indicará si existen diferencias relevantes que justifiquen una aproximación terapéutica «selectiva del cáncer».

Autoría

1. Concepción y diseño del manuscrito: S. Moncada.
2. Recogida de datos: S. Moncada.
3. Análisis e interpretación de los datos: S. Moncada.
4. Redacción, revisión y aprobación del manuscrito remitido: S. Moncada.

Conflicto de intereses

El autor declara que no existe conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Vida y obra del doctor Andrés Laguna. (1990) Junta de Castilla y León. Consejería de Cultura y Bienestar Social. Gráficas Varona, Salamanca.
2. Almeida A, Bolaños JP. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem*. 2001;77:676–90.
3. Almeida A, Moncada S, Bolaños JP. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol*. 2004;6:45–51.
4. Herrero-Méndez A, Almeida A, Fernández E, Maestre C, Moncada S, Bolaños JP. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol*. 2009;11:747–52.
5. Li M, Zhang P. The function of APC/CCdh1 in cell cycle and beyond. *Cell Div*. 2009;4:2.
6. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1974;71:1286–90.
7. Bolaños JP, Almeida A, Moncada S. Glycolysis: A bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci*. 2010;35:145–9.
8. Almeida A, Bolaños JP, Moncada S. E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:738–41.
9. Colombo SL, Palacios-Callender M, Frakich N, de León J, Schmitt CA, Boorn L, et al. Anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1 coordinates glycolysis and glutaminolysis with transition to S phase in human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:18868–73.
10. Krebs HA. Glutamine metabolism in the animal body. En: Mora J, Palacios R, editores. *Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation*. London, New York: Academic Press; 1980. p. 319–29.
11. Newsholme EA, Crabtree B, Ardawi MS. Glutamine metabolism in lymphocytes: Its biochemical, physiological and clinical importance. *Q J Exp Physiol*. 1985;70:473–89.
12. Pérez-Gómez C, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Segura JA, Manzanares E, Ruiz-Sánchez P, et al. Co-expression of

- glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochem J.* 2005;386:535–42.
13. Colombo SL, Palacios-Callender M, Frakich N, Carcamo S, Kovacs I, Tudzarova S, et al. Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:21069–74.
 14. Tudzarova S, Colombo SL, Stoeber K, Carcamo S, Williams GH, Moncada S. Two ubiquitin ligases, APC/C-Cdh1 and SKP1-CUL1-F (SCF)- β -TrCP, sequentially regulate glycolysis during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:5278–83.
 15. Hunt T. Cyclins and their partners: From a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol.* 1991;2: 213–22.
 16. García-Higuera I, Manchado E, Dubus P, Canamero M, Méndez J, Moreno S, et al. Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nat Cell Biol.* 2008;10: 802–11.