



Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid  
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)

**MECANISMOS Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN  
IMPLICADOS EN LA REPROGRAMACIÓN  
METABÓLICA EN CÁNCER DE COLON**

Memoria presentada por la licenciada  
**Inmaculada Martínez Reyes**  
para optar al grado de  
Doctora en Biología Molecular  
por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis: **Dr. José Manuel Cuezva Marcos**  
Madrid, 2012

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Doctor José Manuel Cuezva Marcos, Catedrático del Departamento de Biología Molecular del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid (Septiembre 2008-Septiembre 2012). Durante este periodo, la licenciada Inmaculada Martínez Reyes ha disfrutado de una Beca de La Fundación La Caixa (Septiembre 2008-Junio 2009) y de una beca (Julio 2009-Junio 2011) / contrato (Julio 2011-fecha de hoy) predoctoral del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (JAE-CSIC).

*A mi familia*

*“Lo esencial es invisible a los ojos”.*

*El Principito – Antoine de Saint-Exupéry*



## *Agradecimientos*

En primer lugar, quiero dar las gracias de corazón a mi director de tesis, Pepe Cuezva, por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo. Gracias por tu ayuda, por tus ideas y por las discusiones científicas que tanto me han enseñado. Pero sobre todo tengo que agradecerte tu comprensión y ánimo en los momentos más complicados.

Gracias al Dr. Merrick por acogerme durante tres meses en su laboratorio en Cleveland y haberme dado la oportunidad de vivir una experiencia de la que he podido sacar lecciones más allá de los resultados obtenidos.

Quiero dar las gracias al Dr. D. Carling y a la Dra. A. Woods por ayudarme en el desarrollo del trabajo de AMPK y a los Dr. J.J. Berlanga y el Dr. C. de Haro por sus sugerencias y aportaciones en la discusión del artículo.

Estoy muy agradecida al personal de servicios del CBM que me ha ofrecido su colaboración con muy buena disposición, con una gran profesionalidad y rigor científico en la elaboración de esta tesis. Especialmente quiero destacar a Maite y Verónica de Microscopía, a Fernando y Sandra de Genómica, a Santi de Informática, a David y Helena de Bioinformática, Anabel e Inés de Proteómica y M<sup>a</sup> Cruz y Gema de Seguridad Biológica. Gracias como no a Juani por haberme preparado el medio cientos de veces.

Gracias a todos los compañeros que he tenido durante este tiempo porque sin ellos nada de esto hubiese sido posible. Gracias a Álvaro por haber guiado mis primeros pasos en el mundo de la ciencia, a Marcos por sus dosis de realismo, y a Santi por estar dispuesto a ayudar siempre. Gracias a Imke y Laura porque las dos me han enseñado mucho y siempre con una sonrisa. Gracias a la jefa María por estar pendiente de todos y de todo, a Laura Formetini por hacernos reír con sus historias y por haber estado siempre dispuesta a echarme una mano. Gracias a Javi por traer frescura al laboratorio, y a Fulvio, por ser siempre tan atento. Gracias a Juan Manuel Zapata, María Morán, Joanna, Marta, Irene y Mariví porque aunque hayamos coincidido poco, también pude aprender de vosotros. A Estela, Estefanía, Carmen y David, las nuevas adquisiciones, por preocuparse por mis avances en la última fase de la tesis. Gracias al duende de la Navidad, a la busca-todo, al alma del laboratorio, a la que nos cuida, Margarita. Y un gracias gigante a Cristina, por haberme ayudado tantísimo durante este tiempo y haberme hecho mucho más fácil llegar hasta aquí y ahora y porque sin ti el barrio chino no sería lo mismo.

No puedo olvidarme de los compis del 321 por sus préstamos y charlas. Porque siempre han estado dispuestos a colaborar en todo lo que he necesitado. Y otro gracias enorme a Enrique por sus visitas diarias, por escucharme tan pacientemente, por sus consejos y por la serenidad que me transmite. Gracias también a Cecilio y Carmen que siempre han estado pendientes de la evolución de la tesis.

Durante este tiempo ha habido gente muy especial a mi lado y que ha seguido muy de cerca el desarrollo de esta tesis. Gracias a mis chonis por preocuparse por *la célula* y a

mis chicos de Atocha por devolverme a la tierra cada miércoles. Gracias a todos mis amigos por demostrarme su cariño e incondicionalidad siempre que los he necesitado y gracias a Proacis por darle más sentido a todo lo que hago.

Los valores que he aprendido en mi familia han sido fundamentales para realizar este trabajo con entusiasmo, con ilusión y con mucha dedicación. Mis padres son verdaderos ejemplos de vida para mí y jamás me cansaré de darles las gracias por su amor y porque me lo han dado todo. Además, tengo la suerte de tener a cinco hermanas como cinco soles, que me recuerdan cada día lo bonito que es tenernos las unas a las otras. Gracias por vuestra ayuda y comprensión siempre.

Y el gracias más especial es para ti porque ya sabes que media tesis es tuya por aguantarme tanto y tan bien. Porque me enseñas a tomarme la vida con más calma y a poner mis problemas en perspectiva. Porque me haces feliz, porque llenas mi vida y porque me siento muy afortunada por tenerte a mi lado.







## Abreviaturas

4EBPs	Proteínas de unión a 4E
AICAR	5; aminoimidazol-4-carboxamida 1-β-D-ribofuranosida
AMP/ADP/ATP	Adenina 5' mono/di/trifosfato
AMPK	Proteína quinasa dependiente de AMP
BEC	Índice bioenergético celular
BSA	Albúmina de suero bovino
CoCl <sub>2</sub>	Cloruro de Cobalto
cpm	Cuentas por minuto
DIGE	Electroforesis diferencial en gel
DMOG	Dimetiloxaloliglicina
DNP	2,4-dinitrofenol
dsRNA	RNA de doble cadena
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eIF	Factor de iniciación de la traducción
FBS	Suero fetal bovino
Células G	Línea celular HCT116 de carcinoma de colon tratada con oligomicina con fenotipo glucolítico
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GCN2	General control nonrepressed 2
GFP	Proteína verde fluorescente
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
Hsp60	60KDa heat shock protein
IP	Immunoprecipitación
IRES	Secuencia de iniciación interna de la traducción
Células M	Línea celular HCT116 de carcinoma de colon control con fenotipo mitocondrial
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensajero
mtDNA	DNA mitocondrial
NAC	N-acetilcisteína
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamida-adenina dinucleótido oxidado/reducido
NAD <sup>+</sup> /NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado/reducido
nDNA	DNA nuclear
OCR	Tasa de consumo de oxígeno
OL	Oligomicina
ORF	Marco abierto de lectura

OSR	Respiración sensible a oligomicina
OXPPOS	Fosforilación oxidativa
PABP	Proteína de unión a la cola de poli(A)
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET	Tomografía de emisión de positrones
PFA	Paraformaldehído
pi	Inmunoprecipitados con IgGs de ratón no específicas
PK	Piruvato quinasa
PMSF	Fenilmetil-sulfonilfluoruro
PPP	Vía de las pentosas fosfato
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RNABP	Proteína de unión a RNA
RNP	Complejos ribonucleoproteicos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rRNA	RNA ribosómico
RT	Transcripción Reversa
S.E.M.	Error estándar de la media
SDS	Dodecilsulfato de sodio
siRNA	RNA pequeño de interferencia
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
TF	Factor de Transcripción
tRNA	RNA de transferencia
u.a.	Unidades arbitrarias
UTR	Región no traducida
$\alpha$ 1CA	Mutante de AMPK constitutivamente activo
$\beta$ -mRNA	mRNA de la subunidad $\beta$ -F1-ATPasa





---

**ÍNDICE**

<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
1.1. La mitocondria	11
1.1.1. Estructura y función de la mitocondria	11
1.1.2. Biogénesis mitocondrial	12
1.1.2.1. Control transcripcional	13
1.1.2.2. Control post-transcripcional	14
1.1.3. Estructura y función de la H <sup>+</sup> -ATP sintasa mitocondrial	16
1.2. Metabolismo energético y cancer	17
1.2.1. La enfermedad del cáncer	17
1.2.2. El metabolismo energético en las células proliferativas	18
1.2.3. Metabolismo energético y progresión del cáncer	20
1.2.4. La huella bioenergética del cáncer	22
1.2.5. Regulación de la H <sup>+</sup> -ATP sintasa en cáncer	23
1.2.5.1. Por cantidad de proteína	23
1.2.5.2. Regulación de la actividad	25
1.2.6. Vías de señalización en cáncer	26
1.2.7. Traducción en cáncer	29
1.2.7.1. Iniciación de la traducción	30
1.2.7.2. eIF2 y el complejo de preiniciación	32
1.2.7.3. Regulación de la interacción ribosoma-mRNA	32
1.2.7.4. Regulación del enlace entre la iniciación y la elongación	34
1.2.7.5. Traducción cap-dependiente de mRNAs en cáncer	34
1.2.7.6. Traducción cap-independiente de mRNAs en cáncer	35
1.2.7.7. microRNAs en cáncer	36
1.2.7.8. Regulación de la traducción y cáncer	37
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>47</b>
3.1. Material	47
3.1.1. Líneas celulares	47
3.1.2. Cepas bacterianas	47
3.1.3. Plásmidos	47
3.1.4. Oligonucleótidos	47
3.1.5. Radioisótopos	50
3.1.6. Drogas.	50
3.1.7. siRNAs	50
3.1.8. Fluoróforos	50

3.2. Métodos	50
<b>3.2.1. Biología molecular</b>	<b>50</b>
3.2.1.1. Aislamiento de DNA de cultivos bacterianos	50
3.2.1.2. Digestión del DNA mediante endonucleasas	50
3.2.1.3. Cuantificación y electroforesis de DNA	51
3.2.1.4. Purificación de fragmentos de DNA de geles de azarosa	51
3.2.1.5. Ligación de fragmentos de DNA	51
3.2.1.6. Transformación de células <i>E. coli</i> competentes	51
3.2.1.7. Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para clonaciones	51
3.2.1.8. RT-PCR	52
3.2.1.9. PCR cuantitativa (qPCR)	52
3.2.1.10. Cuantificación del número de copias del DNA mitocondrial	52
3.2.1.11. Clonaciones	53
<b>3.2.2. Métodos de Bioquímica</b>	<b>54</b>
3.2.2.1. Extracción de DNA genómico, RNA y proteína de cultivos celulares	54
3.2.2.2. Extracción de factores de transcripción de cultivos celulares	54
3.2.2.3. Extracción de factores de iniciación de la traducción de cultivos celulares.	55
3.2.2.4. Cuantificación de proteínas	55
3.2.2.5. Marcaje de proteínas con los fluoróforos cy3 y cy5	55
3.2.2.6. Electroforesis de proteínas mono (SDS-PAGE) y bi-dimensional (IEF-SDS-PAGE)	55
3.2.2.7. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida	56
3.2.2.8. Identificación de proteínas por espectrometría de masas	56
3.2.2.9. Fluorografía de proteínas marcadas en geles de poliacrilamida	57
3.2.2.10. Detección inmunológica de proteínas ( <i>Western blot</i> )	60
3.2.2.11. Transcripción <i>in vitro</i>	60
3.2.2.12. Traducción <i>in vitro</i>	60
<b>3.2.3. Biología celular</b>	<b>61</b>
3.2.3.1. Mantenimiento de líneas celulares establecidas en cultivo	61
3.2.3.2. Tratamientos celulares	61
3.2.3.3. Transfección transitoria de plásmidos y de siRNAs	61
3.2.3.4. Microscopía electrónica	62
3.2.3.5. Microscopía de fluorescencia	62
3.2.3.6. Marcaje metabólico de proteínas en células en cultivo	63
3.2.3.7. Velocidad de síntesis de proteínas <i>in vivo</i>	63

3.2.3.8. Estudio del recambio de proteínas mediante pulso y caza	63
3.2.3.9. Inmunoprecipitación (IP)	64
3.2.3.10. Análisis de la activación de factores de transcripción	65
3.2.3.11. Medida del flujo glucolítico	65
3.2.3.12. Medida del consumo de oxígeno en células adheridas a placa	66
3.2.3.13. Citometría de flujo	66
3.2.3.14. Análisis del ciclo y muerte celular por tinción con yoduro de propidio	66
3.2.3.15. Determinación de la producción de radicales libres de oxígeno	67
3.2.3.16. Análisis de la proliferación celular	68
3.2.3.17. Determinación de la carbonilación de proteínas celulares	68
3.2.3.18. Ensayo de la actividad promotora de NFκB	68
3.2.3.19. Determinación de ATP/ADP/AMP	68
3.2.3.20. Determinación de las razones NAD/NADH y GSH/GSSG	69
3.2.3.21. Estadística aplicada	69
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>73</b>
<b>4.1. Caracterización fenotípica de las células de carcinoma colorrectal.</b>	<b>74</b>
4.1.1. Caracterización estructural y metabólica	74
4.1.2. Análisis de la activación de factores de transcripción	75
4.1.3. Las células con fenotipo G tienen estrés oxidativo	79
4.1.4. Estudio de la proliferación y muerte celular en células con fenotipo G	80
4.1.5. El tratamiento con oligomicina reprime la diferenciación mitocondrial	82
<b>4.2. Mecanismos y vías de señalización implicados en la adquisición del fenotipo celular agresivo</b>	<b>83</b>
4.2.1. Represión traduccional de la diferenciación bioenergética de la mitocondria en carcinoma colorrectal	83
4.2.2. Regulación de la represión de la diferenciación mitocondrial	85
4.2.3. Las vías de señalización AMPK y GCN2 reprimen la diferenciación mitocondrial	86
4.2.4. La autofagia se activa en las células con fenotipo agresivo G	88
4.2.5. La activación de AMPK promueve la inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial	89
4.2.6. La represión de la función mitocondrial en las células tumorales requiere del ajuste en el recambio de las proteínas implicadas en el metabolismo energético	93
4.2.7. La inhibición de mTOR reprime la síntesis global de proteínas	95



4.2.8. El proteasoma no parece mediar cambios en el fenotipo de las células G	97
4.2.9. HIF1 $\alpha$ no es el responsable de la represión de la diferenciación bioenergética de las mitocondrias	98
4.2.10. La inhibición de las prolil-hidroxilasas promueve la regulación diferencial de la expresión y de la vida media de las proteínas implicadas en el metabolismo energético	101
4.2.11. El estrés oxidativo dificulta la síntesis de proteínas mitocondriales favoreciendo la adquisición del fenotipo agresivo tumoral	104
4.2.12. Distinto perfil de factores de iniciación de la traducción entre células M y G	105
4.2.13. Los factores de iniciación eIF3D y eIF3E son necesarios para la traducción específica de proteínas mitocondriales	107
4.2.14. Ensayos de competencia en la traducción <i>in vitro</i> entre los mRNAs de $\beta$ -F1 y de GAPDH	110
4.2.15. El 5'UTR del mRNA de GAPDH tiene más afinidad por el eIF4F	112
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>117</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>137</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>145</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>176</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>181</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS****INTRODUCCIÓN**

<b>Figura 1.</b> Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa	11
<b>Figura 2.</b> Estructura de la H <sup>+</sup> -ATP sintasa mitocondrial	16
<b>Figura 3.</b> Metabolismo glucolítico y mitocondrial	19
<b>Figura 4.</b> Los marcadores del cáncer	21
<b>Figura 5.</b> Mecanismos que silencian a la H <sup>+</sup> -ATP sintasa en cáncer y en desarrollo	24
<b>Figura 6.</b> Bases moleculares del cáncer	27
<b>Figura 7.</b> Vía de iniciación de la traducción de proteínas	31

**MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de los clones realizados	53
<b>Figura 9.</b> Anticuerpos monoclonales utilizados para la inmunoprecipitación de proteínas	64

**RESULTADOS**

<b>Figura 10.</b> Fenotipo estructural y bioenergético de células M y G	74
<b>Figura 11.</b> Actividad de factores de transcripción en células M y G	76
<b>Figura 12.</b> Las vías de señalización relacionadas con el cáncer están significativamente afectadas en las células G	78
<b>Figura 13.</b> Las células G tienen más estrés oxidativo que las células M	79
<b>Figura 14.</b> Las células G presentan un fenotipo más proliferativo	81
<b>Figura 15.</b> Estudio del ciclo celular en los fenotipos M y G	81
<b>Figura 16.</b> El tratamiento con oligomicina reprime la expresión de proteínas de la función bioenergética de la mitocondria	82
<b>Figura 17.</b> La función bioenergética de la mitocondria se regula por control traduccional	84
<b>Figura 18.</b> Las tRNA sintetasas mitocondriales están inhibidas en las células G	85
<b>Figura 19.</b> La adaptación de las células al estrés metabólico requiere la activación de AMPK y GCN2	86
<b>Figura 20.</b> El estrés metabólico promueve cambios significativos en las proteínas diana de AMPK y GCN2	87
<b>Figura 21.</b> La inhibición de mTOR promueve la activación de la autofagia	89
<b>Figura 22.</b> La activación de AMPK promueve la inhibición de la fosforilación oxidativa	90
<b>Figura 23.</b> La activación de AMPK conduce a la inhibición de la síntesis de $\beta$ -F1-ATPasa	92
<b>Figura 24.</b> El silenciamiento de ATF4 estimula la función bioenergética de la mitocondria	92
<b>Figura 25.</b> La adaptación metabólica requiere cambios en la regulación de la vida media de las proteínas implicadas en el metabolismo energético	94
<b>Figura 26.</b> La actividad de las vías del metabolismo energético correlaciona inversamente con el recambio de las proteínas implicadas	95
<b>Figura 27.</b> La inhibición de mTOR media la represión de la traducción global de proteínas celulares	96

## Índice

---

<b>Figura 28.</b> El proteasoma no parece estar implicado en la regulación del metabolismo energético	97
<b>Figura 29.</b> HIF1 $\alpha$ no media la reprogramación metabólica en las células de carcinoma colorrectal	98
<b>Figura 30.</b> El tratamiento con CoCl <sub>2</sub> aumenta el recambio de las proteínas implicadas en el metabolismo energético	99
<b>Figura 31.</b> El tratamiento con CoCl <sub>2</sub> no afecta a la velocidad inicial de síntesis de las proteínas implicadas en el metabolismo energético	100
<b>Figura 32.</b> La inhibición de prolil-hidroxilasas afecta a la vida media de las proteínas del metabolismo energético celular	101
<b>Figura 33.</b> El tratamiento con DMOG promueve el cambio metabólico de las células y de la vida media de las proteínas implicadas en el mismo	102
<b>Figura 34.</b> El tratamiento con DMOG promueve la inhibición selectiva de la traducción de proteínas mitocondriales	103
<b>Figura 35.</b> El estrés oxidativo dificulta la síntesis específica de proteínas mitocondriales	104
<b>Figura 36.</b> Análisis de los factores de iniciación de la traducción en células M y G	105
<b>Figura 37.</b> Las células M y G presentan distinto perfil de los factores de iniciación de la traducción	106
<b>Figura 38.</b> Confirmación por <i>western-blot</i> de la expresión de factores de iniciación de la traducción	108
<b>Figura 39.</b> Silenciamiento de los factores de iniciación de la traducción y su efecto en la expresión y velocidad inicial de síntesis de las proteínas $\beta$ -F1, GAPDH, y Hsp60	109
<b>Figura 40.</b> El elemento 5'UTR del mRNA de GAPDH es esencial para su traducción	110
<b>Figura 41.</b> Ensayo de competencia de traducción <i>in vitro</i> de los mRNAs de $\beta$ -F1, GAPDH y la quimera (5'UTR-GAPDH)- $\beta$ -F1-mRNA	111
<b>Figura 42.</b> Análisis del efecto de los factores de iniciación de la traducción eIF2 y eIF4F en la traducción <i>in vitro</i> de los mRNAs de $\beta$ -F1 y GAPDH	112
<b>Figura 43.</b> Análisis del efecto de los inhibidores de los factores de iniciación de la traducción dsRNA y m <sup>7</sup> GDP en la traducción <i>in vitro</i> de los mRNAs de $\beta$ -F1 y GAPDH	113

## DISCUSIÓN

<b>Figura 44.</b> Representación esquemática de las vías de señalización implicadas en la adquisición del fenotipo agresivo en cáncer de colon	124
<b>Figura 45.</b> Actividad enzimática y degradación	127

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Genes y proteínas relacionadas con la H <sup>+</sup> -ATP-sintasa	17
<b>Tabla 2.</b> Factores de iniciación y reguladores de la traducción alterados en cáncer	33
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótido	49
<b>Tabla 4.</b> Anticuerpos empleados en este trabajo	59
<b>Tabla 5.</b> Estudio comparativo del número de genes diana de los factores de transcripción con los resultados del análisis transcriptómico entre células M y G	76
<b>Tabla 6.</b> Vías de señalización implicadas en la adquisición del fenotipo G	77
<b>Tabla 7.</b> Las células G presentan una menor expresión de la mayoría de los factores de iniciación de la traducción	107





## ***SUMMARY***



Reprogramming of energy metabolism to an enhanced aerobic glycolysis is a phenotypic trait of cancer in which mitochondrial dysfunction represents a key event that is required for tumor progression. Treatment of colon cancer cells with the H<sup>+</sup>-ATP synthase inhibitor oligomycin reprograms energy metabolism towards the aggressive phenotype that is compatible with *in vivo* tumor promotion. In the present study, we have addressed the study of the mechanisms and signaling pathways that trigger the metabolic switch of colon cancer cells treated with oligomycin. We show that changes in the bioenergetic phenotype lead to the activation of cellular pathways involved in survival and in the inhibition of cell death. The acquisition of the aggressive phenotype is exerted by selective repression of the expression of nuclear-encoded mitochondrial proteins that participate in the bioenergetic and metabolic function of the organelle. The expression and synthesis of glycolytic proteins are not affected in this situation. At the H<sup>+</sup>-ATP synthase level, repression of the bioenergetic function is exerted by translation silencing of the mRNA encoding its catalytic subunit ( $\beta$ -F1-ATPase), emphasizing the relevance of translational control for normal mitochondrial function and for the progression of cancer. In fact, translation initiation factors are differentially expressed and modified in cells with the aggressive phenotype. In this regard, we illustrate that translation of mitochondrial proteins has a higher dependency on eIF3D and eIF3E than the translation of the glycolytic ones. In addition, translational control is also exerted by relevant *cis*-acting elements in the mRNAs involved. The bioenergetic dedifferentiation of mitochondria is signaled by the activation of the stress kinases AMPK and GCN2. In addition, metabolic reprogramming of the aggressive phenotype requires the stabilization of mitochondrial proteins and the concurrent increase in the turnover of glycolytic enzymes strongly suggesting that biological catalyst, at variance with chemical ones, are worn-out during *in vivo* catalysis. Metabolic reprogramming in colon cancer cells is not controlled by HIF1 $\alpha$  over-expression or by the activity of the proteasome. In contrast, synthesis of mitochondrial proteins seems to be dependent on the regulated activity of the mTOR pathway. Moreover, we illustrate that the inhibition of the activity of prolyl-hydroxylases signals the specific repression of the synthesis and degradation of the mitochondrial proteins, providing first evidence for the relevance of these proteins in the regulation of the bioenergetic function of the mitochondria. Overall, our results demonstrate that the proteins involved in energy metabolism are differentially regulated at the level of translation and degradation offering to the cell a safeguard strategy for metabolic adaptation under stressful conditions.





# ***RESUMEN***



La reprogramación metabólica hacia un aumento de la glucólisis aerobia es una característica fenotípica de la célula tumoral que implica una disfunción mitocondrial. El tratamiento de células de carcinoma colorrectal con oligomicina, un inhibidor de la H<sup>+</sup>-ATP sintasa, reprograma el metabolismo energético celular promoviendo la adquisición del fenotipo agresivo compatible con la progresión del tumor *in vivo*. En este trabajo, hemos analizado los mecanismos y vías de señalización que promueven el cambio metabólico de las células de carcinoma colorrectal tratadas con oligomicina. Los cambios en el fenotipo bioenergético de las células propician la activación de vías de señalización implicadas en supervivencia y en evitar la muerte celular. La adquisición del fenotipo agresivo se ejerce por la represión de la expresión de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo que participan en la función bioenergética y metabólica del orgánulo. La expresión y síntesis de las proteínas glucolíticas no se ve afectada en esta situación. En cuanto a la H<sup>+</sup>-ATP sintasa, la represión de la función bioenergética se ejerce por el silenciamiento de la traducción del mRNA que codifica su subunidad catalítica ( $\beta$ -F1-ATPasa), enfatizando la relevancia del control traduccional para la función mitocondrial así como para la progresión del cáncer. De hecho, los factores de iniciación de la traducción están diferencialmente expresados y modificados covalentemente en las células con fenotipo agresivo. En este sentido, mostramos que la traducción de proteínas mitocondriales es más dependiente de los factores eIF3D y eIF3E que la traducción de las proteínas de la vía glucolítica. Además, el control traduccional también depende de elementos en *cis* de los mRNAs implicados. La desdiferenciación bioenergética de la mitocondria está señalizada por la activación de las quinasas de estrés, AMPK y GCN2. Mostramos que la reprogramación metabólica requiere la estabilización de las proteínas mitocondriales acompañada de un aumento del recambio de las enzimas glucolíticas lo que sugiere que los catalizadores biológicos, a diferencia de los químicos, se agotan durante la catálisis *in vivo*. La reprogramación metabólica en las células de carcinoma colorrectal no se regula por la sobre-expresión de HIF1 $\alpha$  o por la actividad del proteasoma. Por contra, la síntesis de las proteínas mitocondriales parece ser dependiente de la actividad de la vía de señalización de mTOR. Finalmente, demostramos que la inhibición de la actividad de las prolil-hidroxilasas señala la represión específica de la síntesis y degradación de las proteínas mitocondriales poniendo de manifiesto por vez primera la relevancia de estas proteínas en la regulación de la función bioenergética de la mitocondria. En su conjunto, nuestros resultados demuestran que las proteínas implicadas en el metabolismo energético están reguladas diferencialmente por control de la traducción y degradación de las mismas lo que ofrece a la célula una estrategia para su adaptación metabólica en situaciones de estrés.



# ***INTRODUCCIÓN***

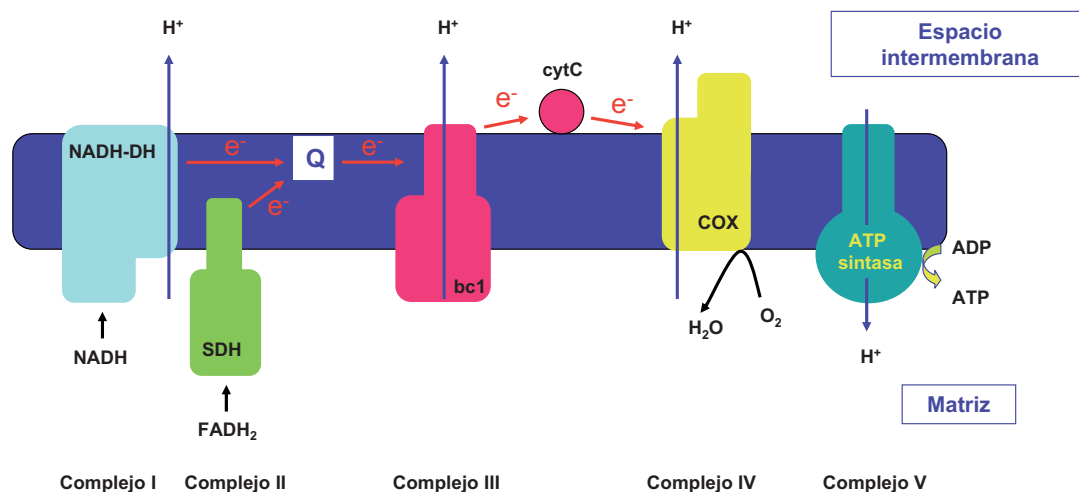


## 1. INTRODUCCION

### 1.1. La mitocondria.

#### 1.1. 1. Estructura y función de la mitocondria.

Las mitocondrias son orgánulos celulares altamente dinámicos que juegan un papel fundamental en la fisiología de las células eucariotas. Las mitocondrias se componen de dos membranas, una membrana externa (ME) y otra membrana interna (MI). Ambas se diferencian tanto en función como en actividad enzimática y separan tres compartimentos: el citosol, el espacio intermembrana (EM) y la matriz mitocondrial (Lithgow y cols., 1997; Sylvestre y cols., 2003). Recientemente se ha descrito la relevancia del complejo proteico MINOS (“Sistema de Organización de la Membrana Mitocondrial Interna”) para el mantenimiento de la arquitectura de la membrana mitocondrial (Zerbes y cols., 2012). Las mitocondrias tienen su propio sistema genético, de transcripción y traducción, pero sin embargo, tan sólo el 1% de las proteínas mitocondriales están codificadas por el DNA mitocondrial (mtDNA). La gran mayoría de las proteínas mitocondriales se codifican en el genoma nuclear (Attardi y Schatz, 1988; Scarpulla, 2008). Las mitocondrias son orgánulos encargados de generar la energía metabólica en forma de ATP. Lo hacen mediante la oxidación de sustratos en un proceso acoplado a la fosforilación oxidativa (OXPHOS). La  $H^+$ -ATP sintasa es el complejo clave en este proceso, ya que utiliza el gradiente electroquímico generado por la oxidación del NADH y  $FADH_2$  en la cadena respiratoria para la formación de ATP mediante la fosforilación del ADP (Fig. 1) (Boyer, 1997a).



**Figura. 1. Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa.** El diagrama indica las vías de transferencia electrónica (rojo) y la traslocación de protones (azul). Los electrones se transportan desde los complejos I (NADH-DH) y II (SDH) hasta el complejo III (bc1) por la coenzima Q (Q) soluble en la membrana y desde el complejo III hasta el complejo IV (COX) por la proteína de la membrana periférica citocromo *c* (cytC). El transporte electrónico (rojo) genera un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna (flechas azules). El bombeo de  $H^+$  hacia afuera de la mitocondria y su retorno exergónico impulsa la síntesis de ATP (flecha amarilla) en el complejo V o  $H^+$ -ATP sintasa.



La cadena respiratoria mitocondrial se compone de una serie de complejos multiproteicos que se encuentran en la membrana interna. El modelo fluido de organización de la cadena respiratoria en la mitocondria propone que los complejos se mueven aleatoriamente en la membrana mitocondrial y los electrones fluyen entre los complejos conectados por los transportadores CoQ y citocromo *c* (cyt *c*) (Fig. 1) (Hackenbrock y cols., 1986). Sin embargo, una nueva alternativa propone que los complejos están organizados en estructuras más grandes formando supercomplejos (modelo sólido) para transportar los electrones de manera más eficiente y desempeñar mejor la función respiratoria (respirosomas) (Lenaz y Genova, 2007). En la actualidad este modelo cuenta con observaciones consistentes que muestran la co-migración electroforética de los diferentes complejos en condiciones nativas (Acin-Perez y cols., 2008).

La importancia de la mitocondria en el contexto celular, no se limita tan solo a su función como productora de energía, sino que además, la mitocondria interviene en la señalización por calcio (Satrustegui y cols., 2007) y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Brunelle y cols., 2005). Además, es un orgánulo fundamental en procesos bioquímicos importantes como son el metabolismo de los aminoácidos y lípidos, así como la biosíntesis del grupo hemo, la descarboxilación oxidativa del piruvato y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la oxidación de ácidos grasos, y la producción de precursores de la urea y de la gluconeogénesis. Además de su papel central en estos procesos bioquímicos, las mitocondrias son reguladores clave en el control de la muerte celular y recientemente se ha descrito también su participación en la defensa del sistema inmunitario y en la regulación de la autofagia y la mitofagia (Youle y Narendra, 2011; Sanchez-Arago y cols., 2012). Las dos funciones fundamentales de la mitocondria, la regulación del metabolismo energético y la muerte celular, están molecular y funcionalmente integradas (Sanchez-Arago y cols., 2012). Los ROS, como productos de la mitocondria, juegan un papel muy importante en el control de la muerte celular.

### **1.1. 2. Biogénesis mitocondrial.**

Alteraciones genéticas y epigenéticas que impidan el correcto funcionamiento de la mitocondria están implicadas en el desarrollo de un espectro muy amplio de enfermedades, como son la diabetes, las enfermedades neurodegenerativas (Ortega y Cuezva, 2004; Wallace, 2005; Moran y cols., 2012) y el cáncer (Cuezva y cols., 2009). Sin embargo, no todos los tejidos se ven igual de afectados antes una disfunción mitocondrial ya que la capacidad de la OXPHOS es tejido dependiente (Rossignol y cols., 1999; Kunz, 2003). El contenido de las mitocondrias y los mecanismos que regulan la estructura, la composición molecular e incluso la función del orgánulo son distintos dependiendo del tipo celular y del tejido (Pagliarini y cols., 2008 3370). Es más, dependiendo de los requerimientos energéticos de la célula, el fenotipo mitocondrial puede ser ajustado (Biswas y cols., 1999; Cuezva y cols., 2002; Kulawiec y cols., 2006). La morfología mitocondrial está constantemente

regulada por eventos de fusión, fisión y motilidad (Suen y cols., 2008 3632) que vinculan la morfología del orgánulo a su funcionalidad y al desarrollo del tipo celular (Abdelhaleem, 2004 3637; Szabadkai y cols., 2004 3633; Benard y cols., 2007 416; Chi y cols., 2007 3635). Además, el correcto funcionamiento de la dinámica de la mitocondria es esencial para el mantenimiento de sus funciones y para asegurar la herencia mitocondrial (Westermann, 2010 3807). Se han descrito dos programas con regulación diferente, proliferación y diferenciación mitocondrial (Cuezva y cols., 1997), como responsables del aumento en el contenido de orgánulos por célula y de su acoplamiento energético, respectivamente.

La biogénesis de la mitocondria es un proceso complejo que requiere la expresión coordinada del genoma nuclear y mitocondrial (Scarpulla, 2008). El DNA mitocondrial (mtDNA) es una molécula circular de doble hebra que codifica 13 polipéptidos implicados en OXPHOS, 2 rRNAs (12S y 16S) y 22 tRNAs esenciales para la síntesis de proteínas en la mitocondria (Attardi y Schatz, 1988; Fernandez-Silva y cols., 2003). La expresión del mtDNA se regula a distintos niveles (replicación, transcripción, traducción y post-traducción) para contribuir finalmente a la actividad de la OXPHOS (Fernandez-Vizarra y cols., 2008).

#### **1.1.2.1. Control transcripcional.**

Se han descrito varios factores de transcripción (FTs) nucleares que son necesarios para el mantenimiento y la expresión del mtDNA (Sprengull y cols., 2004; Falkenberg y cols., 2007) y para la biogénesis mitocondrial (Scarpulla, 2008). Estos factores pueden dividirse en dos subtipos: los que se unen a promotores de genes de la respiración y genética mitocondrial, los factores NRF-1 y NRF-2 y los co-activadores como los de la familia PGC. Estos últimos no se unen directamente al DNA pero interaccionan con factores de transcripción que participan en la regulación de genes implicados en la actividad mitocondrial (Scarpulla, 2008). La actividad y expresión diferencial de los co-activadores puede ser modulada por una variedad de señales extracelulares que proporcionan un mecanismo para ajustar el fenotipo bioenergético específico de la célula y del tejido (Scarpulla, 2008).

Recientemente, se ha descrito que el transportador mitocondrial PNC1 juega un papel muy importante en el control de la replicación del DNA mitocondrial y que es por tanto clave en la biogénesis del orgánulo (Favre y cols., 2010). También hay numerosos estudios que muestran que una serie de factores de transcripción nucleares con funciones muy bien caracterizadas en el núcleo, se encuentran también en la mitocondria (Szczepanek y cols., 2012). La fracción de FTs mitocondriales (mitoFTs) es muy pequeña en comparación con los niveles que hay en el citosol y en el núcleo (5-10%). Los mitoFTs están implicados en una gran variedad de procesos celulares como son la apoptosis, respiración mitocondrial y en el control de la expresión de genes mitocondriales. La mayoría de los FTs que residen en la mitocondria regulan la respiración y la biogénesis mitocondrial (Szczepanek y cols., 2012). Se ha descrito que defectos en la función o en la expresión de estos mitoFTs resultan en un

incremento en la producción de ROS, presumiblemente porque desacoplan la función de los complejos I y III de la cadena respiratoria. No se conoce mucho sobre los mecanismos que median el transporte de los FTs a la mitocondria ya que la mayoría de ellos no contiene una secuencia que señalice su localización mitocondrial. Las proteínas mitocondriales Hsp70 y Hsp90 parecen estar implicadas en el transporte de algunos de estos factores (Szczepanek y cols., 2012). Otros mitoFTs se transportan a la mitocondria mediante otros mecanismos como la ubiquitinación en el caso de p53 (Marchenko y cols., 2007).

Una vez en la mitocondria, los FTs se dividen en aquellos que se localizan dentro de la mitocondria (STAT3, NFkB, CREB y MEF2D) y aquellos que se asocian con la membrana externa mitocondrial (p53 e IRF3) (Szczepanek y cols., 2012). Los mitoFTs que se localizan dentro de la mitocondria son los más importantes a la hora de regular la biogénesis y la actividad del orgánulo. En el caso de CREB, se ha descrito que regula la expresión de genes mitocondriales en la neurona (Lee y cols., 2005). La eliminación de CREB de la mitocondria disminuye la expresión de algunos mRNAs mitocondriales que codifican proteínas del complejo I dificultando así su correcta actividad (Lee y cols., 2005). MEF2 también está implicado en la regulación de la biogénesis de la mitocondria (Naya y cols., 2002). Se ha descrito que MEF2D es necesario para la expresión del gen mitocondrial ND6 que codifica uno de los componentes del complejo I. La menor expresión de MEF2D promueve por tanto la desregulación de la actividad del complejo I, la producción de ROS y una caída en los niveles de ATP (She y cols., 2011). Otros estudios relacionan también la actividad de los mitoFTs NFkB y STAT3 con la regulación de la actividad mitocondrial (Bottero y cols., 2001; Wegrzyn y cols., 2009). La existencia de proteínas que regulen la respuesta celular al estrés tanto en el núcleo como en la mitocondria tiene sentido ya que ambos son cruciales en la regulación de la supervivencia y el crecimiento celular (Szczepanek y cols., 2012).

### 1.1.2.2. Control post-transcripcional.

#### - Localización de los mRNAs.

Unos de los aspectos importantes para la biogénesis de la mitocondria es el transporte de los mRNAs nucleares que codifican proteínas mitocondriales a las proximidades de la mitocondria, un proceso altamente conservado desde levadura hasta células humanas (Lithgow y cols., 1997; Sylvestre y cols., 2003). Es un proceso de gran importancia ya que muchos de los mRNAs que codifican componentes de los complejos mitocondriales se ven afectados por éste (Egea y cols., 1997; Marc y cols., 2002; Garcia y cols., 2007). El transporte de mRNAs a compartimentos subcelulares específicos es un proceso secuencial y que consta de varias etapas. El proceso implica la participación del citoesqueleto y de elementos reguladores *cis* localizados principalmente en la región 3'UTR del mRNA (Ricart y cols., 1997; Marc y cols., 2002; Ricart y cols., 2002; Rodriguez y cols., 2008;

Martin y Ephrussi, 2009; Garcia y cols., 2010). En hepatocitos de rata, el mRNA de la subunidad catalítica de la H<sup>+</sup>-ATP sintasa β-F1-ATPasa (β-mRNA) está presente en grandes complejos ribonucleoproteicos (β-RNP) (~150 nm) que se encuentran preferencialmente asociados a la membrana mitocondrial externa (Egea y cols., 1997; Ricart y cols., 1997). El ensamblaje y la localización subcelular adecuados del β-RNP en mamíferos depende de elementos reguladores *cis* situados en el 3'UTR y en el marco abierto de lectura (ORF), y de un conjunto de proteínas que interaccionan con estos elementos del mRNA (Ricart y cols., 2002).

La familia de proteínas de unión al RNA Pumilio (PUF) se unen a la región 3'UTR del mRNA y modulan su expresión en una gran variedad de especies eucariotas (Wickens y cols., 2002). La proteína Puf3p se asocia con 256 mRNAs asociados a polisomas unidos a la mitocondria en *S. cerevisiae* de los cuales un 90% son mRNAs mitocondriales codificados en el núcleo (Gerber y cols., 2004; Saint-Georges y cols., 2008). De forma coherente, cepas que sobre-expresan Puf3p muestran disfunciones respiratorias y mitocondrias con morfología y motilidad aberrantes (Gerber y cols., 2004; Garcia-Rodriguez y cols., 2007). Sorprendentemente, se ha observado también la existencia de 224 transcritos asociados a la mitocondria que carecen del sitio de unión a Puf3p de manera que tanto su expresión como su localización no dependen de esta proteína (Saint-Georges y cols., 2008). Este hecho sugiere la existencia de al menos dos vías independientes para que el mRNA sea transportado y localizado específicamente en la mitocondria. Un estudio reciente en el laboratorio ha identificado nueve proteínas de unión a mRNA (RNABPs) que interaccionan *in vitro* con el β-mRNA y que podrían estar implicadas en la localización del transcrito (Ortega y cols., 2010).

#### **- Control de la estabilidad y traducción de los mRNAs.**

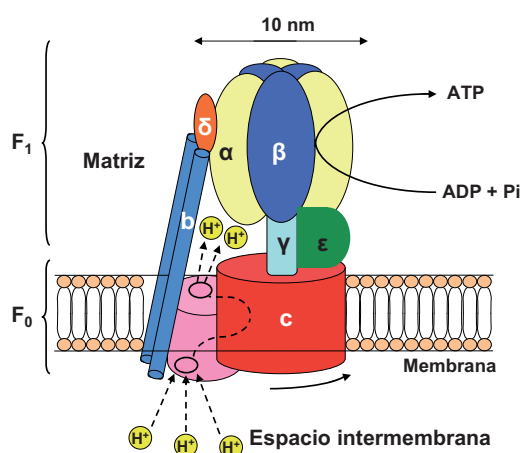
Los mRNAs que codifican subunidades del sistema OXPHOS se acumulan en el hígado fetal como resultado de cambios en su estabilidad (Izquierdo y cols., 1995b; Ostronoff y cols., 1995). Durante esta etapa los mRNAs se encuentran traduccionalmente enmascarados. Es en el momento del nacimiento cuando los mRNAs comienzan a traducirse (Luis y cols., 1993; Izquierdo y cols., 1995b; Ostronoff y cols., 1996a; Izquierdo y Cuezva, 1997) con el objetivo de conseguir la diferenciación funcional de la mitocondria (Valcarce y cols., 1988). Resultados similares se encontraron en hepatomas de rata donde se observó que la inhibición de la biogénesis mitocondrial se debía a una acumulación de transcritos que codifican proteínas relacionadas con la OXPHOS debido a un aumento en su estabilidad (de Heredia y cols., 2000).

Desde el punto de vista del mecanismo, la regulación de la traducción de los mRNAs se puede explicar por diferencias en la afinidad de éstos por la maquinaria de traducción o por la acción de proteínas de unión a los mRNAs (Willers y Cuezva, 2011). También juegan un papel importante los miRNAs que interaccionan con secuencias que contienen elementos

clave en la regulación de la traducción de los mRNAs (Willers y Cuezva, 2011). En el caso concreto del  $\beta$ -mRNA sabemos que el control post-transcripcional de su expresión es muy relevante en el desarrollo (Izquierdo y cols., 1990; Luis y cols., 1993; Izquierdo y cols., 1995b; Izquierdo y Cuezva, 1997), durante el ciclo celular (Martinez-Diez y cols., 2006) y en células tumorales (de Heredia y cols., 2000; Willers y cols., 2010). En el apartado 1.2.5.1 se detallan aspectos relevantes relacionados con la traducción de  $\beta$ -mRNA.

### 1.1.3. Estructura y función de la $H^+$ -ATP sintasa mitocondrial.

La  $H^+$ -ATP sintasa mitocondrial es un complejo multiproteico de 650 KDa presente en la membrana plasmática de bacterias, en la membrana tilacoidal del cloroplasto de plantas y en la membrana interna de la mitocondria en levadura, plantas y animales. Esta enzima se compone de 16 subunidades; 10 forman el sub-complejo hidrofóbico embebido en la membrana interna,  $F_0$ -ATPasa y las otras 6 forman un complejo hidrofílico o complejo  $F_1$ -ATPasa expuesto a la matriz y que contiene el núcleo catalítico (Boyer, 1997b) (Fig. 2). La tabla 1 resume los distintos genes que forman parte de los dos sub-complejos, así como su estequiometría. El análisis por cristalografía de la estructura del complejo  $F_1$  mostró que está compuesto por 3 subunidades catalíticas ( $\beta$ - $F_1$ -ATPasa) y 3 subunidades reguladoras ( $\alpha$ - $F_1$ -ATPasa) que se disponen alrededor del tallo central constituido por la subunidad  $\gamma$  como si fueran gajos de una naranja (Fig. 2) (Abrahams y cols., 1994). El complejo  $F_0$  es un motor rotatorio que aprovecha el paso de protones a su través para generar cambios conformacionales en el sub-complejo  $F_1$  para la síntesis del ATP. Cuando los protones pasan por el canal que atraviesa la membrana, el complejo  $F_0$  rota y el tallo de la subunidad  $\gamma$ , que está firmemente sujeto al complejo  $F_0$ , rota sobre el anillo  $\alpha_3\beta_3$ , forzando una secuencia de cambios conformacionales en las subunidades  $\beta$  catalíticas que promueven la síntesis del ATP (Fig. 2) (Boyer, 1993; Yoshida y cols., 2001; Capaldi y Aggeler, 2002).



**Figura 2. Estructura de la  $H^+$ -ATP sintasa mitocondrial.** Disposición de las subunidades de la  $H^+$ -ATP sintasa. El complejo  $F_0$  unido a la membrana contiene el canal de protones y está ligado al complejo  $F_1$  por un tallo periférico (compuesto por la subunidad  $\delta$  y dos subunidades  $b$ ) y por la subunidad  $\gamma$ . El anillo formado por las subunidades  $c$  de  $F_0$  está unido a las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$  y forman el eje central del rotor. El dominio  $F_1$  contiene tres subunidades  $\beta$  catalíticas (en azul) y tres subunidades  $\alpha$  no catalíticas (en amarillo) que se acomodan alternadamente formando un anillo. Cuando los protones atraviesan el complejo  $F_0$ , el anillo (en rojo) rota y como resultado la subunidad  $\gamma$  central gira dentro del anillo  $\alpha_3\beta_3$  provocando que los sitios de unión catalítica sufran cambios conformacionales que llevan a la síntesis de ATP.

La proteína  $\beta$ -F1-ATPasa está codificada por un único gen en el genoma nuclear humano (Neckelmann y cols., 1989) y de rata (Izquierdo y cols., 1995a) y su transcripción produce una única especie de mRNA (Ricart y cols., 1997), a diferencia de otras subunidades del mismo complejo ( $\alpha$  y  $\gamma$ ) (Breen, 1988; Neckelmann y cols., 1989). Por este motivo, variaciones en la cantidad relativa de la proteína suelen reflejar cambios en la actividad transcripcional del gen y/o de la traducción del mensajero. Más recientemente, se ha demostrado en modelos de levadura la implicación de la  $H^+$ -ATP sintasa, concretamente de las subunidades e y g, en la dimerización y correcto plegamiento de la membrana mitocondrial interna (Giraud y cols., 2002; Paumard y cols., 2002; Goyon y cols., 2008). Así mismo, se ha sugerido que el inhibidor fisiológico de la  $H^+$ -ATP sintasa, IF1, realiza la misma función en la mitocondria de mamífero (Campanella y cols., 2008) aunque esta propuesta está siendo muy discutida (Wittig y Schagger, 2009).

La biogénesis de la  $H^+$ -ATP sintasa, al igual que la biogénesis mitocondrial, requiere de la coordinación de los genomas nuclear y mitocondrial, excepto en algunas especies donde la enzima tienen origen estrictamente nuclear (Ackerman y Tzagoloff, 2005). Además, es fundamental la participación de una serie de factores de ensamblaje para la síntesis, transporte hacia la membrana interna y finalmente oligomerización de las subunidades de la ATP sintasa (Tabla 1). Defectos funcionales en estos factores de ensamblaje pueden resultar fatales. Es el caso de mutaciones en TMEM70, un factor de ensamblaje de la  $H^+$ -ATPasa, que causan deficiencias en la función de la ATPasa y provocan encefalocardiomiopatías mitocondriales neonatales (Cizkova y cols., 2008).

Dominio	Proteína	Gen	Estequiometría
F <sub>1</sub>	$\alpha$	<i>ATP5A1</i>	3
F <sub>1</sub>	$\beta$	<i>ATP5B</i>	3
F <sub>1</sub>	$\gamma$	<i>ATP5C1</i>	1
F <sub>1</sub>	$\delta$	<i>ATP5D</i>	1
F <sub>1</sub>	$\epsilon$	<i>ATP5E</i>	1
F <sub>1</sub>	IF <sub>1</sub>	<i>ATP1F1</i>	2
F <sub>0</sub>	a	<i>MT-ATP6</i>	1
F <sub>0</sub>	b	<i>ATP5F1</i>	1
F <sub>0</sub>	OSCP	<i>ATP5O</i>	1
F <sub>0</sub>	d	<i>ATP5H</i>	1
F <sub>0</sub>	c	<i>ATP5G1/G2/G3</i>	14
F <sub>0</sub>	F6	<i>ATP5J</i>	1
Unido a F <sub>0</sub>	8 o A6L	<i>MT-ATP8</i>	1
Unido a F <sub>0</sub>	g	<i>ATP5L</i>	1
Unido a F <sub>0</sub>	f	<i>ATP5J2</i>	1
Unido a F <sub>0</sub>	e	<i>ATP5I</i>	1
Ensamblaje	AF1	<i>ATPAF1</i>	1
Ensamblaje	AF2	<i>ATPAF2</i>	1
Ensamblaje	TMEM70	<i>TMEM70</i>	1

**Tabla 1. Genes y proteínas relacionadas con la  $H^+$ -ATP-sintasa.** Resumen de los genes, proteínas y estequiometría de las distintas subunidades de la  $H^+$ -ATP-sintasa en humanos y de los factores que participan en su ensamblaje. MT, codificada en el genoma mitocondrial. (Modificado de Sánchez-Aragó et al., ARS, 2012).

## 1.2. Metabolismo energético y cáncer.

### 1.2.1. La enfermedad del cáncer.

El cáncer es un conjunto heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por la existencia de células anormales que proliferan sin control y que tienen capacidad para invadir otros tejidos. En la actualidad el cáncer es la primera causa de mortalidad en hombres y la segunda en mujeres después de las enfermedades cardiovasculares.

Se han descrito más de 200 tipos distintos de cáncer, que se clasifican frecuentemente por el órgano o tejido en que se originan y por el tipo celular concreto implicado. Los carcinomas son tumores que se originan en células epiteliales de

un órgano determinado, representan el 80% de los tumores y se pueden sub-clasificar como adenocarcinomas (glándulas), escamosos o epidermoides (células epiteliales no glandulares), basocelulares (capa de células epiteliales más profunda de la epidermis) y melanomas (melanocitos). Los tumores que no se originan en tejido epitelial son: los sarcomas (células del tejido conectivo), las leucemias (línea mieloide o linfoide) y los linfomas (linfocitos, tumor sólido).

La etiología, desarrollo y terapia depende del tipo de cáncer que se diagnostique. El diagnóstico de un tumor se realiza mediante el estudio anatómo-patológico de una biopsia del mismo y el uso de técnicas de imagen para la detección de la afectación de ganglios linfáticos y la identificación de metástasis. Este tipo de análisis permite clasificar la enfermedad en un estadio concreto de progresión y con esta información, y teniendo en cuenta otras características del paciente, el oncólogo emite un pronóstico y prescribe la terapia más adecuada para cada caso.

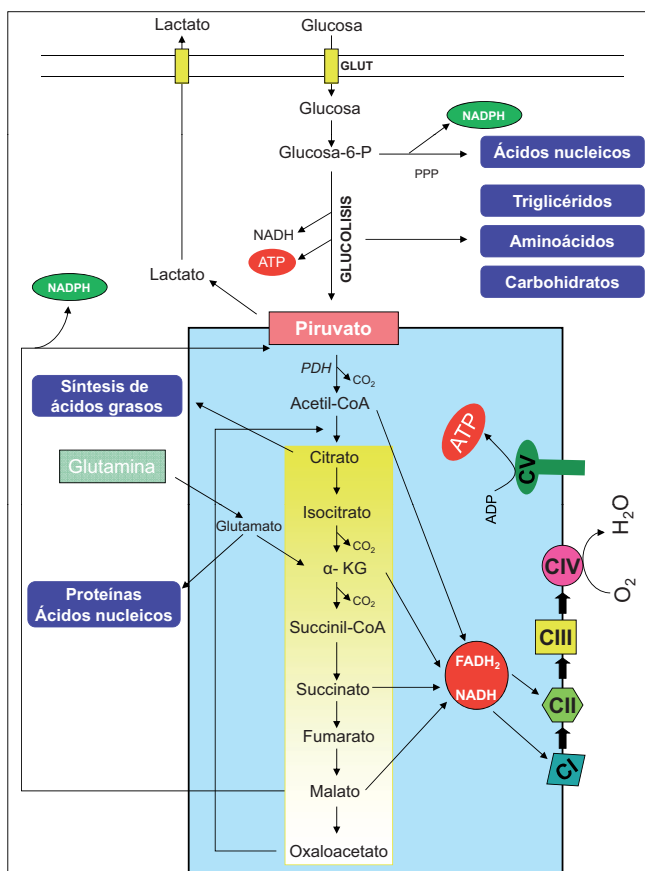
En España, el cáncer de colon es el tercero en frecuencia en los varones, detrás del cáncer de pulmón y próstata. En las mujeres es el segundo en frecuencia, detrás del de mama. Sin embargo, si se tienen en cuenta ambos sexos a la vez el tipo de cáncer más frecuente es el de colon, con casi 28.000 casos nuevos al año. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 65 y los 75 años, con un máximo a los 70, aunque se registran casos desde los 35-40 años.

### **1.2.2. El metabolismo energético en las células proliferativas.**

La glucólisis y la fosforilación oxidativa son las principales vías metabólicas de provisión de energía de las células estando regulada su actividad de forma coordinada por la disponibilidad energética de la célula (Formentini y cols., 2010) (Fig. 3). La glucólisis ocurre en el citoplasma, donde la glucosa se oxida parcialmente a piruvato. El piruvato se puede reducir a lactato regenerando  $\text{NAD}^+$  o bien entrar en la mitocondria donde su esqueleto carbonado se oxidará completamente hasta  $\text{CO}_2$  por la acción secuencial de la piruvato deshidrogenasa y las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Fig. 3). Los electrones obtenidos en la oxidación serán usados por la  $\text{H}^+$ -ATP sintasa para la síntesis de ATP (Fig. 3). En condiciones normales, el ATP es producido fundamentalmente en la mitocondria mediante la fosforilación oxidativa. Sin embargo, se ha comprobado que el colapso del gradiente de protones, con agentes desacoplantes o la inhibición directa de la enzima mediante el tratamiento con oligomicina, activa de forma inmediata el flujo glucolítico (Sanchez-Arago y cols., 2010; Sanchez-Arago y cols., 2012).

La glucólisis es aproximadamente 18 veces menos eficiente que la OXPHOS a la hora de producir energía pero sin embargo, produce muchos de los intermediarios metabólicos necesarios para la biosíntesis de macromoléculas que necesitan las células proliferativas (Fig. 3) (Cuezva y cols., 2009; Formentini y cols., 2010). En las células no proliferativas hay poca demanda de glucosa porque no requieren tantos intermediarios metabólicos. En

este caso la oxidación completa de la glucosa en la mitocondria produce suficiente cantidad de ATP y NADH. La disponibilidad de ATP y NADH coordinan por tanto la actividad de las enzimas metabólicas limitando el flujo de intermediarios y la producción de energía mediante estas dos vías (Cuezva y cols., 2009; Formentini y cols., 2010). Las células proliferativas requieren mucha más cantidad de glucosa ya que necesitan precursores de macromoléculas además del NADPH necesario para su síntesis. El catabolismo de la glutamina también es importante durante la proliferación ya que nutre al ciclo de los ácidos tricarbóxicos de esqueletos carbonados (DeBerardinis y cols., 2008; Cuezva y cols., 2009).



**Figura 3. Metabolismo glucolítico y mitocondrial.**

La célula eucariota cuenta con dos sistemas de producción de energía y de precursores biosintéticos que están espacialmente separados por la compartimentación de la mitocondria. La mitocondria se representa en azul claro. La glucosa es captada por los transportadores de glucosa GLUT. Una vez en el citoplasma la glucosa se puede oxidar secuencialmente en la glucólisis dando lugar a piruvato, NADH y ATP. Numerosos intermediarios de esta ruta son precursores de la biosíntesis de otras moléculas, ácidos nucleicos, carbohidratos, aminoácidos, triglicéridos y poder reductor (NADPH, en verde). El piruvato puede ser reducido a lactato o entrar en la mitocondria y oxidarse gracias a la acción secuencial de la piruvato deshidrogenasa (PDH) y las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA, en amarillo). El TCA genera coenzimas reducidos (NADH y FADH<sub>2</sub>) que se re-oxidan

mediante los complejos respiratorios CI, CII, CIII y CIV para la síntesis de ATP en el CV. El citrato puede ser exportado al citoplasma y colaborar en la síntesis de ácidos grasos. El malato puede ser transformado en piruvato produciendo NADPH como poder reductor biosintético. La glutamina puede entrar en la mitocondria, ser convertida en glutamato y éste catabolizado a su vez en α-KG. El α-KG derivado de la glutamina puede bien reponer el ciclo TCA o ser usado para la síntesis de aminoácidos. (Modificado de Formentini y col, IUBMB Life 2011).

Por otro lado, cuando las células tienen que adaptarse a un microambiente de bajo oxígeno o tienen alteraciones genéticas que alteran la función mitocondrial, el flujo glucolítico y la producción de lactato aumentan para producir la energía suficiente y así garantizar el mantenimiento de las funciones celulares. La activación y la represión de la glucólisis se controla a corto plazo por la regulación alostérica de las enzimas reguladoras implicadas

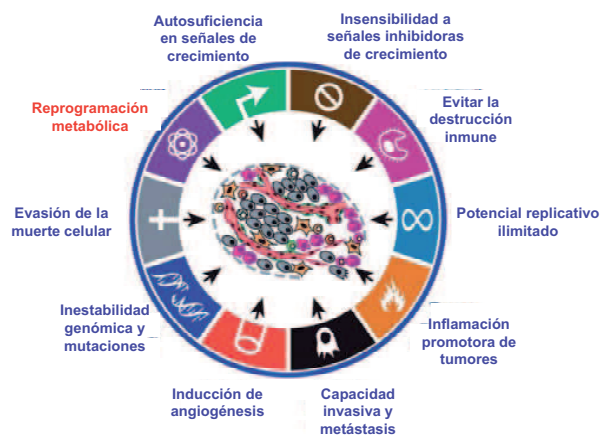


como son la fosfofructoquinasa (PFK), la piruvato quinasa (PK) y la hexoquinasa (HK) (Formentini y cols., 2010) (Fig. 3). Sin embargo, hay situaciones fisiológicas en las cuales la activación de las enzimas de la glucólisis no es suficiente para cubrir las demandas energéticas de las células y mantener la proliferación. La proliferación de hepatocitos durante el desarrollo del hígado fetal (Valcarce y cols., 1988; Cuezva y cols., 2007) y en las células cancerosas (de Heredia y cols., 2000; Sanchez-Arago y cols., 2010) son dos ejemplos donde se puede ver que la activación de los genes de la glucólisis y la represión de la biogénesis mitocondrial son condición necesaria para que se dé la proliferación de las células.

La glucólisis y la fosforilación oxidativa están también estrictamente reguladas durante el ciclo celular de las células eucariotas (Tu y McKnight, 2006). La fase G1 donde se construyen los componentes celulares (la fase oxidativa del ciclo) necesita la actividad funcional de la mitocondria (Schieke y cols., 2008). La progresión hacia la fase de síntesis (fase S) y las fases G2/M (fases reductoras del ciclo) (Tu y McKnight, 2006), están ligadas a la represión de la función mitocondrial (Brand y cols., 1988; Wang y cols., 2006; Cuezva y cols., 2009) y el aumento de la glucólisis. Así, se ha observado que cuando los linfocitos y los timocitos proliferan se incrementa mucho el flujo glucolítico de los mismos disminuyendo el consumo de oxígeno y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que indica una represión de la función mitocondrial (Brand y cols., 1988; Cuezva y cols., 2009). El hecho de que se active la glucólisis y se reprima la respiración mitocondrial en la fase S, es beneficioso para la célula ya que no se producen ROS cuando las moléculas de DNA son más vulnerables al daño oxidativo.

### **1.2.3. Metabolismo energético y progresión del cáncer.**

En el año 2000, los autores Hanahan y Weinberg publicaron una revisión que ha supuesto un hito en el campo del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000). Describieron las seis alteraciones esenciales que sufren las células tumorales durante su transformación: auto suficiencia en señales del crecimiento, insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento, evasión de la muerte celular, potencial proliferativo ilimitado, capacidad invasiva y metástasis de tejidos e inducción de angiogénesis (Hanahan y Weinberg, 2000). No obstante, en los últimos años el campo de investigación del cáncer ha avanzado mucho y recientemente el metabolismo aberrante de las células tumorales se ha añadido como otra característica esencial de la mayoría de las células cancerígenas (Kroemer y Pouyssegur, 2008; Cuezva y cols., 2009; Vander Heiden y cols., 2009; Hanahan y Weinberg, 2011) (Fig. 4). El prestigioso científico alemán Otto Warburg fue el primero en postular que el incremento en el flujo glucolítico de los tumores se debía a una disfunción en la mitocondria (Warburg, 1930, 1956b, a). Esta hipótesis ha sido muy debatida (Dang, 2010), sin embargo hoy día existen muchos datos que demuestran que la mitocondria está estructural y funcionalmente alterada en las células cancerosas (Cuezva y cols., 2009; Sanchez-Arago y cols., 2012).



**Figura 4. Los marcadores del cáncer.**

La ilustración muestra las características esenciales descritas por Hanahan y Weinberg que adquieren la mayoría de las células cancerosas durante el desarrollo tumorogénico. En rojo está marcada la reprogramación metabólica, entendida como la adquisición del fenotipo metabólico glucolítico, que ha sido recientemente incorporada como una condición necesaria para que se produzca la transformación celular. Además, la evasión de la respuesta inmune, la inestabilidad genómica y las mutaciones

así como la inflamación promotora de tumores se han incluido también como características que facilitan la formación del tumor. (Modificado de Hanahan D. y Weinberg RA., Cell 2011).

Aunque clásicamente el cáncer se ha entendido como una enfermedad genética y se relacionaba exclusivamente con mutaciones en oncogenes o en genes supresores de tumores, hoy día sabemos que esta visión es muy reduccionista y hay que tener en cuenta el microambiente del tumor para entender cómo se origina y cómo progresa (Sanchez-Arago y cols., 2010; Sanchez-Arago y cols., 2012). Un estudio reciente demostró que el incremento del flujo glucolítico en respuesta a una respiración mitocondrial anómala es esencial para que las células se transformen hacia el estado maligno (Ramanathan y cols., 2005). De manera contradictoria se ha descrito que las células madre adultas mesenquimatosas dependen en gran medida de la fosforilación oxidativa cuando crecen en cultivo (Funes y cols., 2007). Sin embargo, cuando estas células transformadas fueron implantadas en ratones inmunodeprimidos se observó un incremento en la glucólisis acompañado por la disminución de los genes del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Funes y cols., 2007) destacando la importancia del microambiente para la progresión tumoral. De forma similar, las células transformadas H-RasV12/E1A muestran un aumento de la glucólisis y una disminución de la respiración mitocondrial a medida que se incrementa el potencial tumorogénico de las mismas (de Groof y cols., 2009). Así mismo, se ha descrito que una mayor infiltración de gliomas en el cerebro se relaciona con una menor actividad de la respiración mitocondrial (Keunen y cols., 2011).

Con objeto de profundizar en la contribución de la mitocondria en cáncer, se han generando recientemente en el laboratorio líneas celulares isogénicas de cáncer de colon que expresan diferentes niveles de  $\beta$ -F1-ATPasa para evaluar la contribución de la bioenergética mitocondrial en la progresión del cáncer (Sanchez-Arago y cols., 2010). Las células con menor expresión de  $\beta$ -F1-ATPasa tenían un aumento muy significativo del flujo glucolítico y ausencia de actividad OXPHOS. Además, presentaban un fenotipo mucho más agresivo, ya que cuando se implantaban en ratones inmunodeprimidos generaban tumores *in vivo*

mucho más rápido (Sanchez-Arago y cols., 2010). El análisis molecular de los tumores derivados de las diferentes líneas celulares implantadas reveló que la progresión tumoral requiere la selección de las células que tienen reprimida la función mitocondrial. Este resultado destaca una vez más la importancia del microambiente en la progresión tumoral (Sanchez-Arago y cols., 2010). El tratamiento de las células cancerosas con dicloroacetato restauró parcialmente la diferenciación funcional de las mitocondrias, deteniendo la proliferación y promoviendo la regresión del tumor. Estos resultados enfatizan el carácter reversible del metabolismo energético en el cáncer, pudiendo ser éste su talón de Aquiles (Kroemer y Pouyssegur, 2008; Sanchez-Arago y cols., 2010).

De acuerdo con una disfunción bionérgica de la mitocondria en cáncer, se han descrito numerosas mutaciones en el DNA mitocondrial en distintas neoplasias (Brandon y cols., 2006). Además, mutaciones en las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos también relacionan la disfunción mitocondrial con la oncogénesis (King y cols., 2006; Dang y cols., 2009). Hay una gran cantidad de estudios que apoyan genéticamente (D'Errico y cols., 2011) y farmacológicamente (Wang y Moraes, 2011) la función protectora de la mitocondria frente a la progresión del cáncer. Así, se ha descrito que PGC1 $\alpha$  media la activación de la actividad mitocondrial y evita el cáncer de colon en diferentes modelos animales mediante la producción de ROS y la estimulación de la apoptosis (D'Errico y cols., 2011). La acumulación de alteraciones genéticas en genes de la fosforilación oxidativa en cáncer de colon también apoya la función supresora de tumores de la mitocondria (Sheffer y cols., 2009). De hecho, en este estudio se confirmó que sólo las alteraciones genéticas que afectaban a los genes de la fosforilación oxidativa correlacionaban con una mayor progresión del cáncer de manera que una baja fosforilación oxidativa predecía un peor pronóstico de la enfermedad (Sheffer y cols., 2009). Además, la sirtuina SIRT3 que se localiza en la mitocondria ejerce una función supresora de tumores manteniendo la integridad de las mitocondrias y el metabolismo (Kim y cols., 2010). Consistentemente, el resveratrol mejora la función mitocondrial y evita que se produzcan enfermedades metabólicas porque activa SIRT1 y PGC1 $\alpha$  (Lagouge y cols., 2006). Estos resultados han propiciado el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a las transformaciones metabólicas que se dan en el tumor (Tennant y cols., 2010; Barbosa y cols., 2012).

#### **1.2.4. La huella bioenergética del cáncer.**

Nuestro laboratorio ha desarrollado una aproximación proteómica sencilla para determinar la *huella bioenergética* del cáncer. Inicialmente, el estudio consistió en el análisis de la expresión de  $\beta$ -F1-ATPasa como marcador de la fosforilación oxidativa en biopsias de tejido normal y tumoral del mismo paciente. Se determinó la expresión de Hsp60 como proteína estructural de la mitocondria, así como de la enzima glucolítica gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) (Cuezva y cols., 2002). De esta manera se realizó la estimación del potencial bioenergético de la mitocondria según la razón  $\beta$ -F1-ATPasa/

Hsp60 y del *Índice Bionergético Celular (BEC)* evaluando la razón  $\beta$ -F1-ATPasa/Hsp60/GAPDH (Cuezva y cols., 2002; Isidoro y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005). Posteriormente, el *BEC* se ha simplificado mediante el análisis de la razón  $\beta$ -F1/GAPDH que informa de la actividad mitocondrial global de la célula (Lopez-Rios y cols., 2007; Sanchez-Arago y cols., 2010; Aldea y cols., 2011; Sanchez-Arago y cols., 2012). Los índices bioenergéticos reflejan los niveles en los cuales la actividad bioenergética de la mitocondria puede estar comprometida en cáncer.

Se analizó la expresión de la *huella bioenergética* en pacientes con cáncer de pulmón, mama, colon, esófago, estómago, riñón y siempre se observó una menor expresión de  $\beta$ -F1-ATPasa y una correlación inversa con la expresión de GAPDH en la mayoría de los carcinomas estudiados (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2009). La caída de la razón  $\beta$ -F1-ATPasa/GAPDH sugiere un déficit de la actividad mitocondrial en las células tumorales tal y como postuló Otto Warburg.

Además, la expresión de la proteína  $\beta$ -F1-ATPasa es un marcador pronóstico que permite discriminar pacientes que poseen un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad en cáncer de mama (Isidoro y cols., 2005; Ortega y cols., 2008), colon (Cuezva y cols., 2002; Lin y cols., 2008; Aldea y cols., 2011) y pulmón (Cuezva y cols., 2004; Lopez-Rios y cols., 2007). Además, la huella bioenergética es también un marcador de la respuesta a quimioterapia (Shin y cols., 2005; Santamaria y cols., 2006; Lin y cols., 2008; Sanchez-Arago y Cuezva, 2011). Recientemente, hemos observado mediante la cuantificación de la huella bioenergética que aunque los tumores sean de distinto origen, tienen una huella bioenergética similar (Acebo y cols., 2009; Aldea y cols., 2011).

La relevancia funcional de la huella bioenergética se ha puesto de manifiesto al haberse demostrado la existencia de una correlación inversa entre el valor de este marcador en tumores de pulmón y la tasa de captura de glucosa mediante la técnica de tomografía de emisión de positrones (FDG-PET) (Lopez-Rios y cols., 2007).

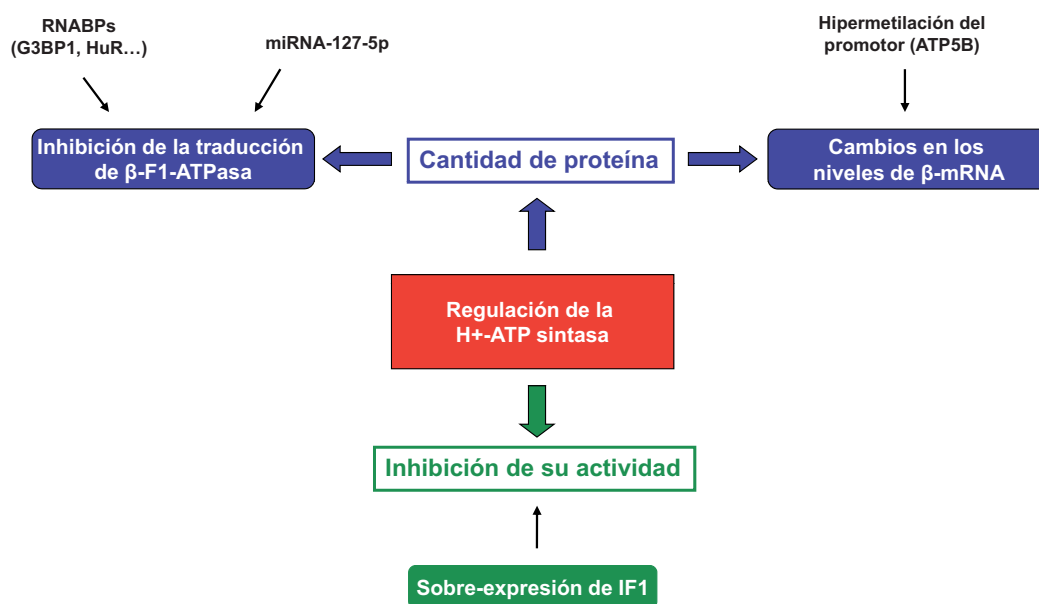
### **1.2.5. Regulación de la H<sup>+</sup>-ATP sintasa en cáncer.**

#### **1.2.5.1. Por cantidad de proteína.**

Uno de los principales objetivos de nuestro laboratorio es la caracterización de los mecanismos que median la inhibición de la H<sup>+</sup>-ATP sintasa en cáncer. Uno de los mecanismos fundamentales implica la regulación de la traducción de  $\beta$ -F1-ATPasa (Fig. 5). El  $\beta$ -mRNA se agrupa formando estructuras de gran tamaño, que se pueden observar en el núcleo, citoplasma y asociadas a la membrana externa de la mitocondria (Egea y cols., 1997) y que, además, pueden estar relacionadas con la traducción localizada de  $\beta$ -mRNA (Egea y cols., 1997; Ricart y cols., 1997). La región 3'UTR de  $\beta$ -mRNA es un elemento clave en la regulación de la traducción de  $\beta$ -F1-ATPasa en rata y en humano (Izquierdo y Cuezva, 1997; de Heredia y cols., 2000; Izquierdo y Cuezva, 2000; Ricart y cols., 2002; Willers y cols., 2010). Como se ha comentado previamente, hemos demostrado que la expresión de

$\beta$ -F1-ATPasa está controlada a nivel de la traducción de su mRNA en desarrollo del hígado fetal (Izquierdo y Cuezva, 1997; Cuezva y cols., 2007; Willers y cols., 2012), durante el ciclo celular (Martinez-Diez y cols., 2006) y en carcinoma de rata (de Heredia y cols., 2000) y de humano (Willers y Cuezva, 2011) ya que los niveles de  $\beta$ -mRNA no varían. En levaduras, se ha descrito que la región 3'UTR del  $\beta$ -mRNA es un elemento esencial para la adecuada localización mitocondrial y traducción del transcrito (Margeot y cols., 2002; Margeot y cols., 2005; Garcia y cols., 2010).

El control de la traducción de  $\beta$ -mRNA durante el desarrollo (Izquierdo y Cuezva, 1997) y en cáncer (de Heredia y cols., 2000; Willers y cols., 2010) implica la unión de proteínas de unión al transcrito (Fig. 5). La unión de estas proteínas está regulada por la disponibilidad energética de la célula y su estado redox (Izquierdo y Cuezva, 2005).



**Figura 5. Mecanismos que silencian a la  $H^+$ -ATP sintasa en cáncer y en desarrollo.** El diagrama representa los distintos mecanismos que afectan a la actividad o al contenido de la  $H^+$ -ATP sintasa en los tumores humanos y durante el desarrollo. La sobre-expresión del factor de inhibición de la  $H^+$ -ATP sintasa, IF1 en tumores humanos impide la actividad de la  $H^+$ -ATP sintasa y promueve el cambio metabólico de las células cancerosas. El silenciamiento de la traducción del RNA mensajero de  $\beta$ -F1-ATPasa ( $\beta$ -mRNA) en distintos carcinomas y durante el desarrollo está mediado por la interacción de diferentes proteínas de unión al mRNA (RNABPs) como por ejemplo G3BP1 y HuR. Además, el miRNA-127-5p interacciona con la región 3'UTR del  $\beta$ -mRNA e inhibe su traducción durante el desarrollo del hígado fetal. La reducción de los niveles del  $\beta$ -mRNA se produce por la hipermetilación del promotor del gen de  $\beta$ -F1-ATPasa (ATP5B) en leucemia mieloide crónica.

La unión de estas proteínas de unión al mRNA en la región 3'UTR estaría dificultando estéricamente la iniciación de la traducción (Izquierdo y Cuezva, 1997; Cuezva y cols., 2007). Recientemente, se han podido identificar nueve RNABPs que interaccionan *in vitro* con el  $\beta$ -mRNA como se ha citado previamente (Ortega y cols., 2010). Las proteínas identificadas están implicadas en transcripción, corte y empalme, transporte del RNA al citoplasma y en el procesamiento, localización, estabilidad y traducción del mRNA (Ortega

y cols., 2010). Una de las proteínas que se identificó fue HuR que es un regulador de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Aunque se observó que HuR no juega un papel relevante en la regulación de la expresión de  $\beta$ -F1-ATPasa, sí que constituye un buen marcador pronóstico de pacientes con cáncer de mama (Ortega y cols., 2008).

Se ha analizado la interacción *in vivo* de las proteínas NPM1, IMP1 y G3BP1 con el  $\beta$ -mRNA y su posible relevancia a la hora de regular su traducción (Ortega y cols., 2008). Se ha descrito que G3BP1 inhibe de manera específica la traducción de  $\beta$ -mRNA tanto *in vivo* como *in vitro* mediante la unión de la proteína al 3'UTR del mRNA (Ortega y cols., 2010). Esta unión estaría impidiendo la comunicación entre el 3'UTR y el 5'UTR del mensajero que es necesaria para la traducción de los mensajeros eucariotas (Ortega y cols., 2010). De hecho, la unión de G3BP1 al 3'UTR del  $\beta$ -mRNA impide que el mensajero se movilice a los polisomas (Ortega y cols., 2010). G3BP1 está más expresada en tumores y en diversas células cancerosas (Guitard y cols., 2001; Barnes y cols., 2002; Zhang y cols., 2007b). Por tanto, G3BP1 mediante la inhibición de la traducción de  $\beta$ -F1-ATPasa puede contribuir a la menor expresión de  $\beta$ -F1-ATPasa y por tanto a una menor huella bioenergética del cáncer propiciando el cambio metabólico de las células cancerosas hacia un metabolismo más glucolítico (Ortega y cols., 2010).

Más recientemente, hemos descrito que el miRNA-127-5p controla la traducción del mensajero de  $\beta$ -F1-ATPasa mediante su unión al 3'UTR reprimiendo su traducción sin afectar su abundancia (Fig. 5) (Willers y cols., 2012). Mientras que el miRNA-127-5p está altamente expresado en el hígado fetal humano, no se expresa en hígado adulto ni en las células cancerígenas. Este hecho minimiza su potencial papel regulador de la actividad bioenergética de la mitocondria en cáncer pero sugiere su relevancia en el control de la traducción durante el desarrollo del hígado (Willers y cols., 2012). Estos datos en humano coinciden con resultados previos de nuestro laboratorio en rata, ya que confirman la relevancia de la regulación de la traducción de  $\beta$ -F1-ATPasa en desarrollo y por tanto en el control de la actividad bioenergética de la mitocondria en el hígado humano (Willers y cols., 2012).

Contrariamente a los resultados encontrados en carcinomas de mama, colon y pulmón, donde se ha demostrado que la regulación de  $\beta$ -F1-ATPasa se ejerce por control de la traducción, se ha descrito que el silenciamiento de la expresión de  $\beta$ -F1-ATPasa en leucemia mieloide crónica está mediado por la hipermetilación del promotor del gen (Li y cols., 2010a) (Fig. 5).

#### **1.2.5.2. Regulación de la actividad.**

Recientemente hemos demostrado que la sobre-expresión del inhibidor fisiológico de la  $H^+$ -ATP sintasa, IF1 (Pullman y Monroy, 1963; Cabezon y cols., 2000; Gledhill y cols., 2007) silencia la actividad de la  $H^+$ -ATP sintasa en carcinomas de mama, colon y pulmón

(Sanchez-Cenizo y cols., 2010) (Fig. 5). IF1 es una proteína pequeña, de 86 aminoácidos que originalmente se describió como inhibidor de la actividad hidrolasa de la ATP sintasa. Su unión a  $\beta$ -F1-ATPasa previene la función reversa de la  $H^+$ -ATP sintasa y por tanto el gasto de energía en situaciones donde la respiración mitocondrial está alterada (Cabezon y cols., 2000; Gledhill y cols., 2007). La activación de IF1 se produce cuando la mitocondria se despolariza y la proteína forma el dímero activo. Una mutación en la histidina 49 de IF1 elimina la regulación dependiente de pH de IF1 a  $\beta$ -F1-ATPasa de forma que el mutante está presumiblemente unido a  $\beta$ -F1-ATPasa incluso cuando la mitocondria está polarizada (Cabezon y cols., 2000).

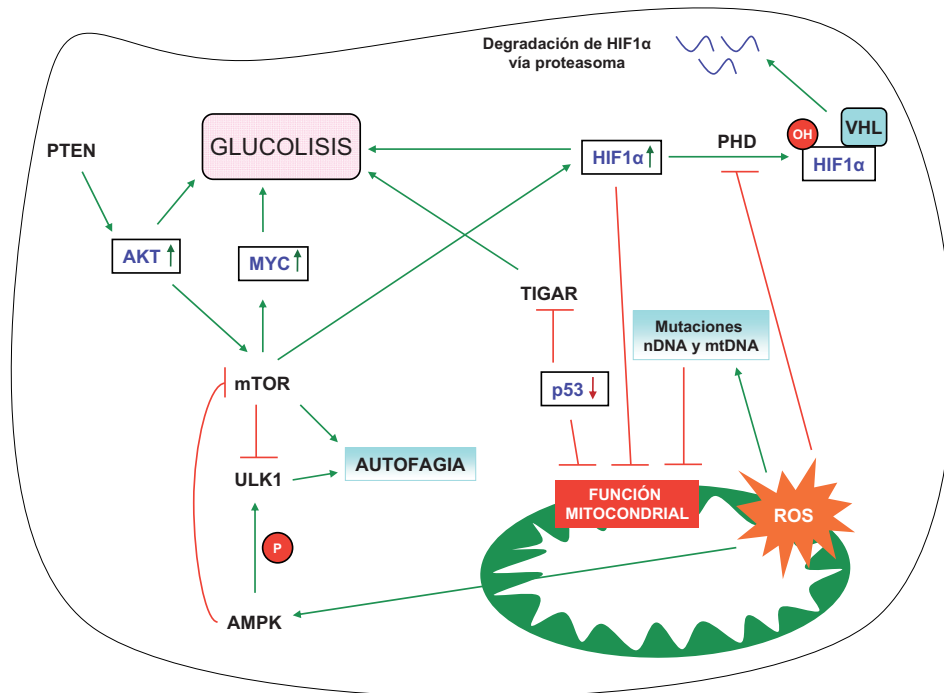
Ensayos de sobre-expresión de IF1 y del mutante H49K en células que expresan bajos niveles de IF1 (Sanchez-Cenizo y cols., 2010) han mostrado que IF1 inhibe la actividad sintasa de la enzima, y provoca un incremento en la glucólisis aeróbica y, simultáneamente, un incremento en el potencial de membrana mitocondrial, imitando los efectos de la oligomicina (Sanchez-Cenizo y cols., 2010). Consecuentemente, el silenciamiento mediado por siRNA de IF1 en células que expresan altos niveles de IF1 provoca la disminución de la glucólisis aeróbica y un incremento en la actividad  $H^+$ -ATP sintasa (Sanchez-Cenizo y cols., 2010). Estos resultados enfatizan la relevancia de la inhibición de la actividad de la  $H^+$ -ATP sintasa para la adaptación metabólica que se produce en las células cancerosas y en el desarrollo del tumor. De hecho, más recientemente, hemos demostrado que IF1 además de promover el cambio metabólico propio de las células tumorales (Sanchez-Cenizo y cols., 2010), desencadena una respuesta mediada por ROS para la activación de NF $\kappa$ B. Esta respuesta promueve proliferación, invasión y supervivencia en células de cáncer de colon (Formentini y cols., 2012). De esta manera IF1 ha emergido como una potencial diana terapéutica en cáncer.

### 1.2.6. Vías de señalización en cáncer

Estudios dirigidos a establecer los vínculos entre el crecimiento tumoral y el aumento de la glucólisis en cáncer han puesto de manifiesto la importancia de la activación o inhibición de determinados oncogenes y genes supresores de tumores, así como de determinadas vías de señalización. Éstas afectan a la glucólisis, a la fosforilación oxidativa o a las dos vías de forma simultánea (Fig. 6) (Cuezva y cols., 2009; Locasale, 2009; Vander Heiden y cols., 2009; Dang, 2012).

Se han descrito mutaciones que promueven una mayor actividad de oncogenes como c-myc que activa la transcripción de genes glucolíticos como el transportador de glucosa GLUT1, aumentando la captura de glucosa y la producción de lactato (Fig. 6) (Osthus y cols., 2000). c-myc tiene también un papel directo en la biogénesis mitocondrial y en la progresión del ciclo celular y en tumorogénesis (Morrish y cols., 2008). Además, una represión de c-myc mediada por los miRNAs 23a y 23b promueve la glutaminólisis que es una vía metabólica muy importante en la proliferación celular (Gao y cols., 2009).

La desregulación de c-myc resulta en el incremento de la expresión de la proteína de unión a RNA hnRNPI (PTB), hnRNPA1 y hnRNPA2 en tumores humanos (David y cols., 2010). Estas proteínas están implicadas en la inclusión del exón 10 en el procesamiento del mRNA de la piruvato quinasa isoforma embrionaria PKM2, enzima que promueve la glucólisis aeróbica y la formación de tumores (Christofk y cols., 2008).



**Figura 6. Bases moleculares del cáncer.** El diagrama ilustra las diversas rutas que pueden inducir el fenotipo glucolítico o reprimir la función mitocondrial en las células cancerosas. Mutaciones de ganancia de función en los oncogenes Akt y c-myc conllevan un aumento en el flujo glucolítico a través de la inducción de enzimas glucolíticas. La inactivación de PTEN por defectos en la respiración mitocondrial resulta en la activación de Akt que conlleva la activación de mTOR. Deficiencias en el metabolismo y respiración mitocondrial pueden promover la producción de ROS. Estos ROS activan a la quinasa de estrés AMPK. AMPK promueve la fosforilación de ULK1 e inhibe mTOR activando así la vía de la autofagia. Mutaciones de pérdida de función en el supresor tumoral p53 estimulan la glucólisis mediante la inactivación de TIGAR y comprometen la respiración mitocondrial simultáneamente. Los ROS inactivan a las prolin-hidroxilasas (PHD) favoreciendo la estabilización de HIF1 $\alpha$  que refuerza la glucólisis mediante la estimulación de la actividad de las enzimas glucolíticas y la restricción de la fosforilación oxidativa. Mutaciones de pérdida de función de VHL impiden la degradación de HIF1 $\alpha$  vía proteasoma provocando efectos similares. Por otro lado, los ROS pueden también ocasionar mutaciones en el DNA mitocondrial (mtDNA) y/o nuclear (nDNA) limitando la actividad de la mitocondria en las células tumorales.

El incremento de la proliferación de las células cancerosas genera un microambiente bajo en oxígeno que promueve la estabilización del factor inducible por hipoxia, HIF1 $\alpha$  (Semenza, 2012). HIF1 $\alpha$  induce la expresión de muchas enzimas glucolíticas incluidas LDHA y GLUT1 y coopera con c-myc en la inducción de la expresión de la piruvato deshidrogenasa 1 quinasa (PDK1) y la hexoquinasa II (HK-II). Éstas representan dos



vías adicionales para favorecer el fenotipo glucolítico propio de las células cancerosas (Fig.6) (Kim y cols., 2007). Además, HIF1 $\alpha$  contribuye a la represión de la biogénesis de la mitocondria, inhibiendo la actividad de c-myc (Zhang y cols., 2007a) y afecta a la respiración mitocondrial modificando la composición molecular de la citocromo c oxidasa (Fig.6) (Fukuda y cols., 2007).

En condiciones de normoxia, HIF1 $\alpha$  se hidroxila en un residuo de prolina para permitir que la proteína supresora de tumores VHL (von Hippel-Lindau) la reconozca y se pueda degradar vía proteasoma (Kaelin y Ratcliffe, 2008). Esta hidroxilación es mediada por la familia de las prolin-hidroxilasas 1, 2 y 3 (PHD1-3) que son dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (Bruick y McKnight, 2001; Epstein y cols., 2001). En condiciones de hipoxia, la actividad de las PHDs está inhibida para que HIF1 $\alpha$  se estabilice y ejerza sus funciones. Se ha descrito la necesidad de la producción de ROS mitocondriales en el complejo III para promover la estabilización de HIF1 $\alpha$  (Chandel y cols., 1998; Chandel y cols., 2000; Guzy y cols., 2005; Mansfield y cols., 2005). Un artículo reciente muestra que deficiencias en la enzima fumarato hidratasa en células de cáncer renal inducen el cambio metabólico hacia un metabolismo más glucolítico que conlleva la estabilización de HIF1 $\alpha$  vía producción de ROS (Sudarshan y cols., 2009). Se ha descrito que la estabilización de HIF1 $\alpha$  mediada por ROS se debe a la inhibición de las PHDs (Fig. 6) (Pan y cols., 2007). La deficiencia o la inhibición de PHD1 favorece la adaptación a hipoxia ya que induce la reprogramación metabólica hacia un metabolismo menos oxidativo y más glucolítico mediante la activación de la vía de Ppara (Aragones y cols., 2008). Además, PHD2 se ha relacionado con la síntesis de proteínas, ya que modula la actividad del factor de elongación 2 en situaciones de hipoxia aguda (Romero-Ruiz y cols., 2012). Es interesante destacar que se ha descrito un mecanismo alternativo por el que las células en condiciones hipóxicas consiguen poner en marcha la síntesis de proteínas (Uniacke y cols., 2012). Estos autores muestran como las células son capaces de sustituir la maquinaria de traducción normal por otra que implica la participación de un complejo compuesto por HIF2 $\alpha$ , la proteína de unión a RNA RBM4 y el factor de iniciación de la traducción eIF4E2 (Uniacke y cols., 2012). Este complejo permite la síntesis de proteínas necesarias para la supervivencia celular en condiciones de bajo oxígeno. Estos resultados sugieren que el control de la traducción de proteínas es una de las claves para que la célula tumoral pueda adaptarse a la hipoxia.

Además, ante condiciones de hipoxia, las células tienen que activar vías de señalización que ahorren energía para minimizar el uso de oxígeno (Fig. 6). Una de las respuestas en este sentido es la inhibición de la actividad de la Na/K-ATPasa en un proceso que depende también de la producción de ROS mitocondriales (Dada y cols., 2003). Estos ROS activan a AMPK, una quinasa que actúa como sensor energético de las células (Emerling y cols., 2009; Gusarova y cols., 2009). AMPK es una proteína clave en la regulación del metabolismo energético (Hardie y cols., 2003) y además controla la actividad de mediadores esenciales en la respuesta celular ante situaciones de estrés, como

p53, HuR y mTOR (Fig. 6). AMPK se activa cuando los niveles celulares de ATP son bajos y es importante tanto en la reprogramación metabólica como en la inducción de autofagia (Mihaylova y Shaw, 2011). AMPK promueve la supervivencia de células tumorales bajo estrés metabólico regulando los niveles de NADPH en las células (Jeon y cols., 2012). AMPK media la inhibición de la actividad de la serina/treonina quinasa mTOR con idea de reprimir la síntesis de proteínas que es un proceso celular que demanda mucha energía (Liu y cols., 2006). mTOR además está implicada en la regulación de la autofagia (Sarbasov y cols., 2005) que es una estrategia que utilizan las células cancerosas para su supervivencia (Fig. 6). La inhibición de mTOR mediada por la activación de AMPK se ha relacionado con la mejora de la sensibilidad a cisplatino de células de cáncer de pulmón cuando se silencia Twist1, una proteína muy importante en la transición epitelio-mesénquima (Jin y cols., 2012).

El oncogen Akt es una molécula muy importante ya que señala vías que promueven la proliferación celular y resistencia a muerte. Además, Akt produce una estimulación dosis-dependiente de la glucólisis que correlaciona con la agresividad del tumor *in vivo* (Plas y Thompson, 2005; Govindarajan y cols., 2007). Defectos en la respiración mitocondrial promueven la inactivación de PTEN, que conlleva la activación de Akt y una mayor supervivencia en condiciones de hipoxia (Fig. 6) (Pelicano y cols., 2006).

Numerosos estudios relacionan al gen supresor de tumores p53 con la regulación del metabolismo en cáncer (Fig. 6) (Bensaad y cols., 2006; Matoba y cols., 2006). Se ha descrito que TIGAR reprime la glucólisis y que por tanto en condiciones de pérdida de función de p53 la glucólisis está activada (Bensaad y cols., 2006). Además, la pérdida de función de p53 promueve la represión de la respiración mitocondrial y el cambio metabólico hacia una mayor glucólisis aerobia (Matoba y cols., 2006). También se ha sugerido que p53 media la regulación de la actividad mitocondrial inhibiendo la expresión de parkin (Zhang y cols., 2011). Otros estudios han mostrado la importancia de la cooperación entre NFκB y p53 para modular los cambios metabólicos que se dan en las células tumorales (Johnson y Perkins, 2012). Además, se ha descrito que mutaciones en el gen supresor de tumores E3 ubiquitina ligasa APC/C-Cdh 1 promueven el cambio metabólico de las células hacia el fenotipo Warburg (Almeida y cols., 2010).

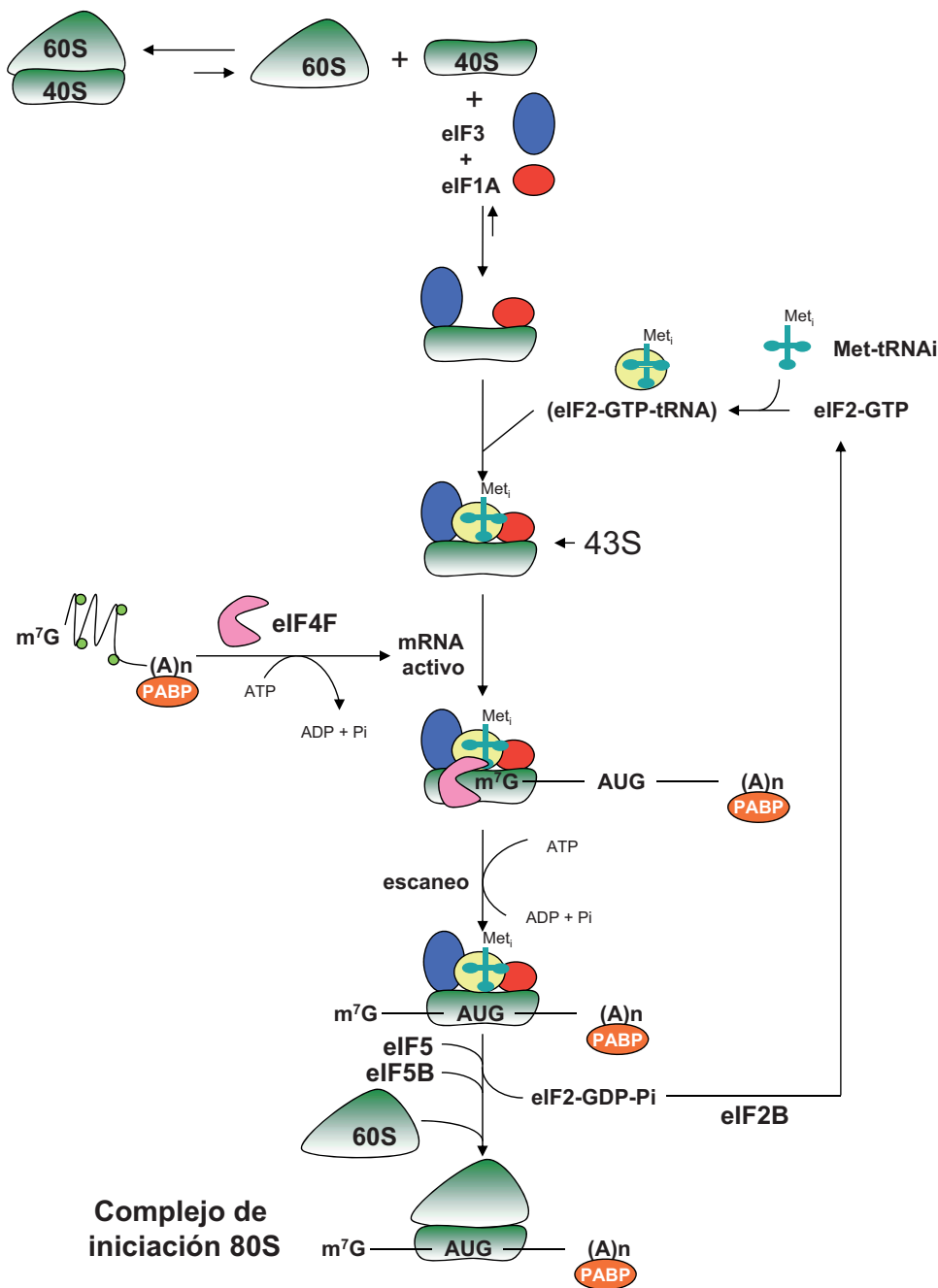
Por último, se han descrito mecanismos epigenéticos que desencadenan el silenciamiento de genes implicados en la glucólisis, en la gluconeogénesis y en la fosforilación oxidativa. Es el caso de la hipermetilación del promotor de la fructosa-1,6 difosfatasa-1 (FBP1) (Liu y cols., 2010) y como se vio anteriormente, la hipermetilación del promotor del gen de la β-F1-ATPasa (Li y cols., 2010a) lo que provoca una evidente disfunción mitocondrial.

### 1.2.7. Traducción en cáncer.

El aumento en la proliferación de las células cancerosas implica también el aumento en la síntesis de proteínas (Johnson y cols., 1976) unido al incremento en el número de ribosomas (Zetterberg y cols., 1995). Es decir que la síntesis global de proteínas tiene un papel fundamental en el control del crecimiento celular, facilitando a las células tumorales proliferar de forma incontrolada. Investigaciones recientes establecen también un papel directo a las proteínas ribosomales en tumorigénesis (Shenoy y cols., 2012). Por ejemplo, la actividad oncogénica de MYC en modelos animales de linfomas reveló que MYC contribuye a la represión de la traducción de mRNAs específicos y que esto incluía una reducción de la expresión de las proteínas ribosomales L24 y L38 (Barna y cols., 2008).

#### 1.2.7.1. Iniciación de la traducción.

Los pasos claves y limitantes en la traducción de la mayoría de mRNAs en las células se dan en la iniciación de la traducción (Fig. 7). En condiciones fisiológicas normales, las dos subunidades que forman el ribosoma, comúnmente llamadas subunidad pequeña (40S) y subunidad grande (60S) se encuentran asociadas formando un ribosoma inactivo (80S). El primer paso para la traducción de proteínas es la generación de un “pool” activo de subunidades 40S que se consigue por la unión del complejo eIF3 (compuesto por muchas subunidades), asistido por el factor eIF1A (Fig. 7). El segundo paso consiste en la unión del metionil-tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub>) a la subunidad 40S. El Met-tRNA<sub>i</sub> se une al 40S como un complejo terciario (eIF2-GTP- Met-tRNA<sub>i</sub>) y forma un complejo llamado 43S (Fig. 7). La formación del complejo 43S se produce gracias a los sitios de unión del factor eIF2 con la subunidad 40S y con el factor eIF3, que ya forman parte del ribosoma. El tercer paso consiste en la activación del mRNA. El complejo eIF4F que se compone de las subunidades eIF4A, eIF4E y eIF4G es el encargado de asistir la unión del complejo 43S al extremo 5' m<sup>7</sup>G-cap del mRNA (Fig. 7) (Rogers y cols., 2001). Una vez activo el mRNA se une al complejo 43S del ribosoma y comienza el escaneo del mRNA para encontrar el codón de iniciación de la traducción AUG en un proceso que es ATP dependiente (Fig. 7) (Kozak, 1989). El siguiente paso es la eliminación de todos los factores de iniciación de la traducción del complejo 43S mediante la acción de los factores eIF5 y eIF5B para permitir la unión de la subunidad 60S. Así se forma el ribosoma 80S capaz de iniciar los pasos de elongación necesarios para la síntesis de proteínas (Fig. 7) (Pestova y cols., 2000; Lee y cols., 2002; Shin y cols., 2002). El último paso consiste en la hidrólisis del GTP del complejo terciario para liberar el eIF2-GDP del complejo 43S. Posteriormente el factor eIF2B catalizará el intercambio de GDP a GTP en el factor eIF2. Otras proteínas de unión a mRNA como la proteína PABP, que se une a la cola polyA del mRNA están implicadas en la iniciación de la traducción de proteínas ya que promueven la circularización y comunicación entre los extremos 3' y 5' del mRNA (Fig. 7) (Kahvejian y cols., 2005).



**Figura 7. Vía de iniciación de la traducción de proteínas.** El esquema representa las fases fundamentales en la iniciación de la traducción de proteínas. El primer paso consiste en la preparación de un “pool” de subunidades 40S donde construir el complejo de iniciación de la traducción mediante la unión de los factores de iniciación eIF3 y eIF1A. Posteriormente se produce la unión del complejo terciario (eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub>) a la subunidad 40S. El siguiente paso consiste en activar el mRNA mediante la unión del complejo eIF4F a la secuencia m<sup>7</sup>G-cap del mRNA. Se representan las proteínas de unión al mRNA con círculos pequeños en verde. La proteína PABP que se une a la cola polyA del mRNA se representa en naranja. Una vez activo el mRNA, se une a la subunidad 40S para comenzar el escaneo del mRNA y localizar el codón de iniciación AUG. En este momento actúan los factores eIF5 y eIF5B para eliminar los factores de iniciación del complejo. Se permite así la unión de la subunidad 60S y se forma el complejo de iniciación 80S. Por último, el factor eIF2B participa en el reciclaje del factor eIF2.

### **1.2.7.2. eIF2 y el complejo de preiniciación.**

La actividad del complejo ribosomal de pre-iniciación de la traducción 43S se controla a través de la regulación del estado de fosforilación de eIF2, un factor compuesto por tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad eIF2 $\alpha$  se regula negativamente vía fosforilación. Cuando eIF2 $\alpha$  está fosforilada, se bloquea el reciclaje de la unión del factor a GTP por mediación de eIF2B, inhibiéndose así la síntesis de proteínas. Hay una serie de quinasas encargadas de fosforilar eIF2 $\alpha$  en respuesta a diferentes estreses fisiológicos dirigidos a bloquear la síntesis proteica. Algunos ejemplos son PKR en respuesta a infección viral, PERK en respuesta a defectos en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico y GCN2 en respuesta al déficit de nutrientes e infección viral (Wek y cols., 2006). En el caso de GCN2, se ha demostrado que reprime la traducción de la mayoría de mRNAs vía fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Berlangua y cols., 1999; Berlangua y cols., 2006) pero incrementa la traducción selectiva de ATF4 (Ye y cols., 2010). Si la fosforilación de eIF2 $\alpha$  estimula o previene el desarrollo del cáncer es un tema complejo y que parece depender del contexto celular. En este sentido, se ha descrito que altos niveles de eIF2 $\alpha$  se asocian con tumores cerebrales más agresivos (Tejada y cols., 2009). Por el contrario, una disminución en los niveles de PKR (mayor fosforilación de eIF2 $\alpha$ ) correlacionan con cánceres menos agresivos (Haines y cols., 1993; Haines y cols., 1998). Se ha sugerido que el papel de eIF2 $\alpha$  podría depender del estadio de desarrollo de la enfermedad. La fosforilación de eIF2 $\alpha$  podría ocurrir en los primeros estadios del cáncer en respuesta a un estrés agudo, como por ejemplo hipoxia y reducir así la síntesis de proteínas para facilitar la supervivencia celular (Bi y cols., 2005; Koritzinsky y cols., 2006). A lo largo del desarrollo del cáncer es probable que se desacople la actividad de las quinasas que regulan eIF2 $\alpha$  para desbloquear la inhibición de la síntesis de proteínas que se produce en el origen de la enfermedad. De esta manera, se permite la síntesis de proteínas necesarias para la supervivencia de las células tumorales. En la tabla 2 se resumen los factores de iniciación de la traducción que están implicados en cáncer.

### **1.2.7.3. Regulación de la interacción ribosoma-mRNA.**

El complejo eIF3 está compuesto por 10-13 proteínas que están implicadas en la interacción del complejo 43S con el mRNA unido al eIF4F (Dong y Zhang, 2006). El amplio número de subunidades del que está compuesto y su diversidad de funciones han llevado a la descripción de muchos y muy diferentes papeles de este factor en cáncer. Por ejemplo, se ha descrito que eIF3a está sobre-expresado en varios tumores humanos (Tabla 2) (Silvera y cols., 2010) y su silenciamiento revierte el fenotipo maligno de las células en cultivo (Dong y cols., 2004). Además, se ha descrito que la sobre-expresión de eIF3a desregula la traducción de mRNAs implicados en la regulación de la proliferación celular como por ejemplo CDKN1B (Dong y Zhang, 2003). La sobre-expresión del factor eIF3c

media la hiperactivación de la maquinaria de traducción facilitando la síntesis de proteínas (Zhang y cols., 2007c). Además, eIF3c se une e inhibe al supresor de tumores merlin (Scoles y cols., 2006). El factor eIF3h está más expresado en tumores de mama y próstata junto con la sobre-expresión del proto-oncogen MYC (Tabla 2) (Nupponen y cols., 1999).

Factor	Expresión	Cáncer asociado
eIF2 $\alpha$	Aumentada	Colon <sup>[1]</sup> , tiroides <sup>[2]</sup> , cerebro <sup>[3]</sup> , melanomas <sup>[1]</sup> , linfomas <sup>[4,5]</sup> .
eIF3a	Aumentada	Mama, útero, pulmón, esófago, estómago <sup>[6-10]</sup> .
eIF3c	Aumentada	Testículos <sup>[11]</sup> , meningiomas <sup>[12]</sup> .
eIF3h	Aumentada	Próstata <sup>[13]</sup> , pulmón <sup>[13]</sup> .
eIF3f	Disminuida	Páncreas, vulva, mama, ovario, intestino delgado, melanomas <sup>[14]</sup> .
eIF3e	Disminuida	Mama, pulmón <sup>[15,16]</sup> .
eIF3e	Aumentada	Mama <sup>[17-19]</sup> .
eIF5A1	Aumentada	Hígado <sup>[20]</sup> .
eIF5A2	Aumentada	Ovario <sup>[21,22]</sup> , colon <sup>[23]</sup> , vejiga <sup>[24,25]</sup> , hígado <sup>[20]</sup> .
eIF6	Aumentada	Colon <sup>[26]</sup> , cabeza y cuello <sup>[27]</sup> .
eIF6	Disminuida	Ovario <sup>[28]</sup> .
eIF4E	Aumentada	Mama, cabeza y cuello, colon, pulmón, próstata, vejiga, útero, melanomas, linfomas <sup>[29-32]</sup> , meningiomas, glioblastomas, astrocitomas <sup>[3]</sup> , esófago <sup>[33,34]</sup> , hígado <sup>[35]</sup> .
fosfo-eIF4E	Aumentada	Próstata <sup>[33,36]</sup> , linfomas <sup>[37]</sup> , ovario <sup>[38]</sup> , colon, sistema gástrico <sup>[39]</sup> , pulmón <sup>[39,40]</sup> .
eIF4G	Aumentada	Mama <sup>[33,41]</sup> , pulmón <sup>[42-45]</sup> .
4EBPs	Disminuida	Próstata <sup>[29,33]</sup> .
4EBPs	Aumentada	Mama <sup>[29,33,46]</sup> , esófago <sup>[34]</sup> .
fosfo-4EBP1	Aumentada	Próstata <sup>[33]</sup> , mama <sup>[29]</sup> , ovario <sup>[38]</sup> , esófago <sup>[34]</sup> , útero <sup>[47]</sup> .
eIF4A	Aumentada	Hígado <sup>[48]</sup> , melanomas <sup>[49]</sup> .

**Tabla 2. Factores de iniciación y reguladores de la traducción alterados en cáncer.** La tabla resume las modificaciones en los niveles de expresión de cada uno de los factores de iniciación y reguladores de la traducción de proteínas observados en distintos tipos de cáncer. Los tipos de cáncer con los que se asocian dichas modificaciones se detallan en la tercera columna. Las referencias indicadas se encuentran en el Anexo II. (Modificado de Silvera et al., Nat Rev Cancer, 2010).

Por el contrario, algunas de las subunidades del complejo eIF3 están menos expresadas en cáncer. El factor eIF3f tiene características supresoras de tumores y está menos expresado en melanomas (Tabla 2) (Shi y cols., 2006). La pérdida de función de eIF3e se asocia también con el desarrollo del cáncer de mama y de pulmón (Marchetti y cols., 2001) (Tabla 2). Sin embargo, algunos estudios más recientes han indicado que el factor eIF3e tiene actividad oncogénica (Silvera y cols., 2010) (Tabla 2). Este hecho sugiere que el papel de eIF3e al igual que ocurre con eIF2 $\alpha$  podría depender también del estadio de desarrollo de la enfermedad o bien del tipo de tumor. Es decir que tanto eIF3f como eIF3e funcionan como supresores de tumores que actúan a nivel de la traducción.

#### **1.2.7.4. Regulación del enlace entre la iniciación y la elongación.**

El factor de iniciación de la traducción eIF5A está altamente conservado ya que es esencial para la proliferación celular. Se expresan dos formas distintas del factor en células humanas eIF5A1 y eIF5A2 (Jenkins y cols., 2001) y ambas se unen al ribosoma para estimular las fases de iniciación (Kemper y cols., 1976; Benne y cols., 1978) y elongación (Saini y cols., 2009). Mayores niveles de expresión de eIF5A2 se asocian con la progresión del cáncer de ovario, carcinoma colorrectal y vejiga (Tabla 2) (Silvera y cols., 2010) mientras que mayores niveles de expresión de las dos isoformas del factor se asocian con carcinomas hepatocelulares (Lee y cols., 2010).

El factor eIF6 tiene dos funciones esenciales. Por un lado participa en la biogénesis de los ribosomas en el nucleolo y por otro lado regula la actividad de los ribosomas en el citoplasma (Miluzio y cols., 2009). Se ha observado que la sobre-expresión de eIF6 en el nucleolo correlaciona con la progresión de carcinomas de cabeza y cuello y colorrectales (Tabla 2) (Silvera y cols., 2010). La sobre-expresión de eIF6 podría incrementar la proliferación celular porque aumenta la biogénesis de los ribosomas. Sin embargo, un estudio de 66 carcinomas de ovario reveló que una menor expresión de eIF6 se asociaba con un peor pronóstico de los pacientes (Tabla 2) (Flavin y cols., 2008). Estas diferencias pueden ser debidas a diferencias en la localización intracelular del factor. Así, niveles reducidos de eIF6 en el citoplasma tendrían una función supresora de tumores y por el contrario, niveles altos del factor en el nucleolo podrían promover el desarrollo tumoral (Gandin y cols., 2008).

#### **1.2.7.5. Traducción cap-dependiente de mRNAs en cáncer.**

El ensamblaje y actividad del complejo eIF4F está regulado por vías de señalización que están implicadas en el desarrollo y progresión del cáncer. eIF4F se compone de tres subunidades. eIF4E es la proteína del complejo que se une a la secuencia cap del mRNA, la subunidad eIF4A es una RNA helicasa dependiente de ATP y la proteína eIF4G participa en el plegamiento de proteínas (Sonenberg y Hinnebusch, 2009). La proteína eIF4E está más expresada en cáncer, siendo por tanto una diana terapéutica atractiva (Tabla 2) (Graff y cols., 2008). La actividad de eIF4E se regula por su disponibilidad, que se controla por la unión de las proteínas 4EBPs al factor y por la fosforilación de éstas en la serina 209 por las quinasas MNK1 y MNK2 que se unen a eIF4G (Sonenberg y Hinnebusch, 2009). Los dos mecanismos son importantes en oncogénesis. Se ha observado un aumento en la expresión de eIF4E en cáncer de mama, cabeza y cuello, colon, pulmón, próstata, vejiga, piel, útero, así como en linfomas (Tabla 2) (Silvera y cols., 2010). Por lo general, su aumento se asocia con menor supervivencia en cáncer de próstata y de esófago (Silvera y cols., 2010). Se ha descrito que la sobre-expresión de eIF4E puede promover la transformación y tumorigénesis incrementando selectivamente la traducción de una serie de mRNAs que tienen un 5'UTR

muy estructurado (Koromilas y cols., 1992a). Estos mRNAs en circunstancias normales tienen más dificultad a la hora de competir por el eIF4F. Cuando eIF4E está más expresado, se forma un mayor número de complejos eIF4F y se traducen con más facilidad. Estos mRNAs codifican proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular (MYC, CCND1 y ODC1), angiogénesis (VEGFA y FGF2) (Koromilas y cols., 1992b; Rosenwald y cols., 1993) y supervivencia celular (MIF) (Mamane y cols., 2007). Es de destacar también que la sobre-expresión de eIF4E incrementa el reclutamiento selectivo de mRNAs que codifican proteínas relacionadas con el cáncer a los polirribosomas (Larsson y cols., 2007).

La fosforilación de eIF4E se ha relacionado con el cáncer de próstata, de ovario y el linfoma de Burkitt (Tabla 2) (Silvera y cols., 2010). Se observa un incremento en la fosforilación de eIF4E en la mayoría de los tumores humanos (Fan y cols., 2009) y se asocia fundamentalmente con los primeros estadios de la enfermedad en cáncer de colon, pulmón y estómago (Fan y cols., 2009). También se ha descrito el papel de las 4EBPs en cáncer. La hiperfosforilación de las 4EBPs vía mTOR las inactiva. Cuando están hipofosforiladas, es decir activas, se unen y secuestran al factor eIF4E bloqueando la traducción de los mRNAs cap-dependientes. Se ha encontrado un aumento en los niveles de fosfo-4EBP1, que implica el aumento de complejos eIF4F funcionales en cáncer de próstata y de mama (Tabla 2) (Silvera y cols., 2010). Una reducción en los niveles de expresión de 4EBP1 se asocia con la menor supervivencia en tumores de próstata, mientras un aumento en la expresión de 4EBP1 y 4EBP2 se asocia con un menor grado de los tumores en cáncer de mama (Tabla 2) (Coleman y cols., 2009). Es decir, que tanto la pérdida de expresión de las 4EBPs como el incremento en su fosforilación, favorecen la función del factor eIF4E y por tanto se asocian con la progresión del cáncer y una menor supervivencia.

Un aumento en la expresión de eIF4G se ha asociado con cáncer de mama y de pulmón (Tabla 2) (Silvera y cols., 2010). Los altos niveles de eIF4G favorecen la traducción de mRNAs que son IRES-dependientes. Los mRNAs que cuentan con este mecanismo como alternativa, son mRNAs que responden a situaciones de estrés, proangiogénesis y supervivencia (Braunstein y cols., 2007; Silvera y Schneider, 2009). Aunque no se ha investigado con mucha profundidad el papel de eIF4a, hay estudios que relacionan una sobre-expresión de este factor con hepatocarcinomas (Shuda y cols., 2000) y melanomas (Eberle y cols., 1997) (Tabla 2).

#### **1.2.7.6. Traducción cap-independiente en cáncer.**

Se ha descrito que la traducción de genes clave para la proliferación celular, diferenciación y apoptosis como son HIF1 $\alpha$ , VEGFA o Bcl-2 se lleva a cabo mediante traducción mediada por IRES (Holcik, 2004). Como se ha comentado anteriormente, la traducción IRES-dependiente de algunos de los mRNAs requiere altos niveles de expresión del factor eIF4G, que se piensa se une a la secuencia IRES y recluta las subunidades 40S del ribosoma y los factores de iniciación como el eIF3 (Braunstein y cols., 2007; Silvera



y Schneider, 2009). Uno de los ejemplos es el mRNA de MYC que utiliza el factor eIF4G para iniciar su traducción IRES-dependiente y que se asocia con el desarrollo del mieloma múltiple (Shi y cols., 2008; Spriggs y cols., 2009).

### **1.2.7.7. microRNAs en cancer.**

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs monocatenarios de aproximadamente 22 nucleótidos. Son RNAs no codificantes pero funcionan como reguladores de la expresión de otros genes a nivel post-transcripcional. Se expresan en una amplia variedad de organismos, desde plantas hasta humanos y en algunos casos están bien conservados entre especies (Krol y cols., 2010). Los microRNAs endógenos se transcriben inicialmente como RNAs primarios más largos y bicatenarios con capacidad para formar horquillas (pre-miRNA). Después de su procesamiento en el núcleo por la ribonucleasa drosha, los miRNAs precursores (pre-miRNAs) de aproximadamente 70 nucleótidos se exportan al citoplasma por la exportina 5. Una vez que el pre-miRNA está en el citoplasma es fragmentado por la endonucleasa Dicer y la cadena que contiene el miRNA maduro se integra en el complejo RISC (RNA-induced silencing complex) para ejercer su función (Krol y cols., 2010).

Los miRNA de animales suelen mostrar complementariedad imperfecta con la región 3' UTR de los mRNAs aunque también se ha descrito que se pueden unir a la región 5'UTR (Lytle y cols., 2007) o al marco abierto de lectura (Qin y cols., 2010). Generalmente inhiben la traducción del mRNA diana o inducen su degradación. Sin embargo, se ha descrito también que algunos miRNAs pueden inducir la traducción de algunos de sus mRNAs diana (Vasudevan y cols., 2007; Henke y cols., 2008; Orom y cols., 2008). Un estudio reciente muestra como los niveles de expresión de las proteínas ribosomales influye en la represión de la iniciación de la traducción mediada por miRNAs (Janas y cols., 2012). La especificidad y la función de los miRNA están determinados por los nucleótidos 2-7 de la parte 5' de los miRNA maduros, la región llamada "semilla" del miRNA. Estos nucleótidos deben ser obligatoriamente complementarios al mRNA diana (Lewis y cols., 2005).

El número de dianas potenciales de los miRNA es alrededor de miles (alrededor del 30% de los genes humanos), por lo tanto no es de extrañar que los miRNA regulen un gran número de procesos biológicos como el desarrollo, el destino celular, la apoptosis y el metabolismo (Krol y cols., 2010). El hecho de que regulen procesos tan importantes provoca que cualquier desregulación en la expresión de los miRNAs conlleve grandes problemas en la regulación de la homeostasis celular. Así, cambios en la expresión de diferentes miRNAs se asocian con distintas enfermedades incluido el cáncer (Krol y cols., 2010). Los miRNA pueden funcionar como supresores de tumores o como oncogenes según sus mRNAs diana y el tipo de cáncer (Esquela-Kerscher y Slack, 2006). Un ejemplo de oncomir es el mir-125b-1 ya que se ha descrito que los pacientes con leucemia linfoblástica aguda portan una inserción del pre-miRNA en el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Sonoki y cols., 2005). Por otro lado, se ha demostrado que los miRNAs mir-15a y mir-16-1 funcionan

como supresores de tumores en leucemia linfocítica crónica (LLC) ya que algunos pacientes presentaban deleciones o menor expresión de estos miRNAs (Calin y cols., 2002).

El mapeo de los genes que transcriben miRNAs ha revelado que la mayoría se localizan en regiones del genoma que presentan alteraciones cromosómicas frecuentes y que se relacionan con el desarrollo de tumores (Calin y cols., 2004). Además, algunos estudios relacionan la menor expresión del miRNA let-7, un regulador de la proliferación y la diferenciación celular en *C. elegans*, con el incremento de la tumorigénesis y el peor pronóstico de los pacientes (Bussing y cols., 2008). En otros estudios se ha observado además que los microRNA median la invasión tumoral y la formación de metástasis contribuyendo así a la progresión del cáncer (Ma y Weinberg, 2008; Ma y cols., 2010).

Hoy día se han desarrollado plataformas para estudiar la expresión global de genes que transcriben microRNAs en tejidos normales y tumorales con el objeto de establecer relaciones entre la expresión de los miRNAs y el tipo de tumor, diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (Calin y Croce, 2006). Microarrays de miRNAs, métodos analíticos por citometría de flujo (Lu y cols., 2005) y secuenciación masiva son algunas de las técnicas que se han desarrollado para estudiar la expresión de miRNAs en cáncer (Farazi y cols., ; Creighton y cols., 2009). Estas técnicas han demostrado que el perfil de miRNAs puede distinguir no sólo entre tejido normal y tumoral sino también identificar subtipos de un tipo de cáncer como es el caso del cáncer de mama (Blenkiron y cols., 2007; Sempere y cols., 2007). Además, numerosos estudios demuestran que los miRNAs son biomarcadores del pronóstico de los pacientes (Caramuta y cols., 2010; Li y cols., 2010b), así como de la respuesta al tratamiento (Schetter y cols., 2008; Giovannetti y cols., 2010). Por todo esto, los miRNAs han despertado el interés de la comunidad científica como posibles dianas terapéuticas en la enfermedad del cáncer.

#### **1.2.7.8. Regulación de la traducción y cáncer.**

Existen varias vías de señalización que tienen incidencia en la síntesis de proteínas. La activación de mTOR por la vía de PI3K-Akt que activa la traducción cap-dependiente se observa en diversos tipos de cáncer humanos (Engelman, 2009). La vía de Ras-Erk MAPK también está frecuentemente más activa en cáncer. Esta vía activa a mTOR vía fosforilación e inhibición de TSC2 (Ma y Blenis, 2009). mTOR regula el crecimiento celular y la proliferación así como participa en el desarrollo y progresión del cáncer mediante el control de la traducción de mRNAs específicos, la biogénesis de los ribosomas, la autofagia y el metabolismo celular (Guertin y Sabatini, 2007). mTOR regula la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de 4EBPs, incrementando así la disponibilidad del factor eIF4E para la traducción de las proteínas. Se ha observado que mutaciones en PTEN en tumores de próstata o la activación de Akt en cáncer de mama promueven la hiperfosforilación de las 4EBPs, incrementando la abundancia y disponibilidad de eIF4E (Wu y cols., 1998; Zhou y cols., 2004). Como se ha descrito previamente, estos cambios promueven la traducción

de mRNAs con 5'UTRs muy estructurados (Koromilas y cols., 1992a). mTOR tiene un efecto sobre el crecimiento celular mediante las quinasas S6K1 y S6K2. La actividad de estas dos quinasas está aumentada en tumores que conllevan mutaciones en PTEN, TSC1 o TSC2 (Ruggero y Pandolfi, 2003). Además, se ha descrito como la inhibición de S6K1 previene el crecimiento tumoral (Nakamura y cols., 2008). La activación de S6K1 mediada por mTOR estaría estimulando la traducción cap-dependiente de algunos mRNAs específicos necesarios para el crecimiento celular, la proliferación y la progresión tumoral (Holz y cols., 2005). Recientemente, el grupo de David Sabatini ha identificado un motivo único en el 5'UTR rico en pirimidinas (TOP) o muy similar (TOP-like) que comparten todos los transcritos que regula mTORC1 (Thoreen y cols., 2012). Por otro lado, Hsieh y colaboradores han descubierto un nuevo elemento regulador en *cis* en el 5'UTR de mRNAs sensibles a la regulación mediada por mTOR que también es rico en pirimidinas (Hsieh y cols., 2012).

La actividad antitumoral de la rapamicina, un inhibidor de mTOR, en distintos tipos de cáncer refuerza el papel del control de la traducción de proteínas en tumorigénesis (Guertin y Sabatini, 2007). La inhibición de mTOR estaría induciendo un arresto de ciclo y la inhibición de la traducción cap-dependiente como principales mecanismos de acción antitumorales (Choo y Blenis, 2009). De hecho se ha podido comprobar que otros inhibidores que inhiben más específicamente a mTOR, como Torin 1, bloquean más eficientemente la proliferación celular en los tumores que la rapamicina (Thoreen y cols., 2009). Por estos resultados la inhibición de la traducción cap-dependiente está emergiendo como una posible diana terapéutica que en combinación con los agentes quimioterapéuticos convencionales podría mejorar sustancialmente la lucha contra la enfermedad aunque no en todos los contextos celulares.





# ***OBJETIVOS***



## **2. OBJETIVOS**

La mitocondria desempeña funciones esenciales para la fisiología celular ya que participa en procesos tan importantes como el metabolismo y la función bioenergética, la ejecución de la muerte celular y la señalización intracelular mediada por calcio y por especies reactivas de oxígeno. Por ello, no es de extrañar que alteraciones de la función mitocondrial estén asociadas con diversas patologías, incluido el cáncer. En los últimos años se ha demostrado que la reprogramación metabólica es una característica fenotípica de las células tumorales. Esta reprogramación implica la represión funcional de la mitocondria y un aumento de la glucólisis aerobia tal y como postuló Warburg el pasado siglo. Nuestro grupo ha descrito que la subunidad catalítica del complejo H<sup>+</sup>-ATP sintasa,  $\beta$ -F1-ATPasa, está significativamente menos expresada en tejidos tumorales, poniendo de manifiesto la relevancia de la función bioenergética de la mitocondria en la progresión tumoral. Como objetivo general en esta tesis nos hemos propuesto profundizar en los mecanismos y vías de señalización que participan en la alteración del metabolismo energético de la célula tumoral de carcinoma colorrectal.

En base a estas premisas nos hemos propuesto los siguientes objetivos concretos:

1. Validación y caracterización molecular y funcional de un modelo celular de carcinoma colorrectal inducido por estrés metabólico.
2. Identificación de los mecanismos y vías de señalización implicados en la adquisición del fenotipo celular compatible con la progresión tumoral en carcinoma colorrectal.

A la vista de los resultados obtenidos se definió un tercer objetivo que consistió en:

3. Analizar los posibles mecanismos que promueven la regulación diferencial de la expresión de las proteínas mitocondriales y glucolíticas en las células tumorales.





# ***MATERIALES Y MÉTODOS***



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Material.**

##### **3.1.1. Líneas celulares.**

- HCT116, derivada de carcinoma colorrectal humano.

##### **3.1.2. Cepas bacterianas.**

Para la clonación, mantenimiento y amplificación de plásmidos se han empleado las cepas bacterianas DH5 $\alpha$  y XL-Blue de Escherichia coli. El cultivo de esta cepa se efectuó en medio Luria-Bertani (LB) (1% (p/v) bacto triptona, 0,5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) NaCl) suplementado con Ampicilina o Kanamicina (100 $\mu$ g/ml), dependiendo de la resistencia del plásmido que portan.

##### **3.1.3. Plásmidos.**

Los plásmidos que se han usado en este trabajo son:

- pQE (QIAGEN, Hilden, Alemania):

- Vector de partida para la amplificación de la región codificante de GAPDH.

- pcDNA 3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.):

- Plásmido pNF3ConA que posee el promotor de NF $\kappa$ B bajo el reportero de luciferasa, donado por el grupo del Dr. Manuel Fresno.
- Plásmido CDL-p $\beta$ -GFP- $\beta$ -3'UTR que codifica la proteína fluorescente GFP fusionada al 3'UTR de  $\beta$ -F1-ATPasa humano y a la presecuencia de  $\beta$ -F1-ATPasa de rata, generado en nuestro laboratorio (Martinez-Diez y cols., 2006).
- Plásmido que codifica la subunidad  $\alpha$ 1 de AMPK constitutivamente activa ( $\alpha$ 1CA) donado por el grupo del Dr. David Carling (Fryer y cols., 2002).

- pBS-SK (+) (Stratagen, LA Jolla, CA, EE.UU.):

- Vector de partida para la amplificación del fragmento  $\beta$ -F1 -3'UTR- $\beta$ -F1.
- Clonación de IMR-h $\beta$ -F1-ATPase, IMR-h $\beta$ -F1-ATPase- $\Delta$ 5'UTR, IMR-hGAPDH, IMR-hGAPDH- $\Delta$ 5'UTR, IMR-hGAPDH- $\Delta$ 3'UTR, IMR-(5'UTR-GAPDH)- h $\beta$ -F1-ATPase e IMR- h $\beta$ -F1-ATPase-(3'UTR-GAPDH).

##### **3.1.4. Oligonucleótidos.**

Los oligonucleótidos purificados por HPLC y liofilizados se compraron a Invitrogen, (Carlsbad, CA, EE.UU.). Para generar una disolución de almacenamiento el liofilizado se resuspendió a 4°C con el volumen suficiente de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 2 mM) para obtener una concentración final del oligonucleótido de 100  $\mu$ M y se conservó a -20°C. La disolución de trabajo es 1/10 de la anterior en H<sub>2</sub>O estéril. En la Tabla 3 se proporciona una lista de los oligonucleótidos que se han usado en este trabajo incluyendo la utilidad que se les ha dado.

Nombre	Orientación	Secuencia	Utilidad	Tm (°C)	Long. (nt)
F-KpnI-5UTR-GAPDH	SS	AAAGGAAA <b>GGTACCAAA</b> TTGAGCCCGCAGCCCTCC	Clonación	80	35
R-5UTR-GAPDH-XhoI	AS	AAAGGAAA <b>CTCAGGG</b> GTGCTGAGCGATGTGGCTCG	Clonación	83	37
F-XhoI-CODINGβF1	SS	AAAGGAAA <b>CTCAGAT</b> GTGGGGTTGTGGGTCCG	Clonación	80	35
R-CODINGβF1-EcoRI	AS	AAAGGAAA <b>GAATTC</b> TCACGATGAATGCTCTTCAGCCAG	Clonación	78	39
F-EcoRI-3UTR-GAPDH	SS	AAAGGAAA <b>GAATTC</b> GACCCCTGGACCACCCAGCC	Clonación	80	34
R-3UTR-GAPDH-NotI	AS	AAAGGAAA <b>CGGCCG</b> GGTTGAGCACAGGGTACTTTATTGATG	Clonación	85	44
F-KpnI-5UTR-bF1	SS	AAAGGAAA <b>GGTACCA</b> ATTCACCCCAATGGACCTGCCTA	Clonación	79	38
R-XhoI-5UTR-bF1	AS	AAAGGAAA <b>CTCAGGG</b> CGGTAGTCCGGGTGGAGACTGA	Clonación	83	38
R-3UTR-bf1-EcoRI	AS	AAAGGAAA <b>GAATTC</b> TTTTTTTTTTTTTTCTGAGGGGTGTAC	Clonación	74	44
F-Coding GAPDH-XhoI	SS	AAAGGAAA <b>CTCAGAT</b> GGGAAAGGTGAAGGTCCGGAGT	Clonación	80	38
R-Coding GAPDH-EcoRI	AS	AAAGGAAA <b>GAATTC</b> TACTCCTTGGAGGCCATGTGGG	Clonación	78	38
R-5UTR betaF1 1	AS	AGCGACCGCTGAAGGGGTGA	Secuenciar	67	19
R-5UTR betaF1 2	AS	CTCACCCAAATGCTGGGCC	Secuenciar	66	19
F-3UTR GAPDH	SS	TTTGTCAAAGCTCATTTCCCT	Secuenciar	53	19
R-5UTR GAPDH	AS	ACTTTACCAGAGTTAAAAG	Secuenciar	44	19
h-PKM2-qPCR-L	SS	CAGCCAAAAGGGGACTATCCT	qPCR-SyBR	50	18
h-PKM2-qPCR-R	AS	CCTCAGCCTCACGAGCTATC	qPCR-SyBR	48	19
h-β-F1-qPCR-L	SS	CAGCAGATTTTGGCAGGTG	qPCR-SyBR	51	19
h-β-F1-qPCR-R	AS	CTTCAATGGGTCCCACCATA	qPCR-SyBR	52	20
h-Hsp60-qPCR-L	SS	TGCTATGGCTGGAGATTTTGT	qPCR-SyBR	50	21
h-Hsp60-qPCR-R	AS	CAGCAGCATCCAATAAAGCA	qPCR-SyBR	50	20
h-GAPDH-qPCR-L	SS	AGCCACATCGCTCAGACAC	qPCR-SyBR	53	19
h-GAPDH-qPCR-R	AS	GCCCAATACGACCAAATCC	qPCR-SyBR	51	19
h-G3BP-qPCR-L	SS	CTTTGGTGGTTTGTCACTG	qPCR-SyBR	59	20
h-G3BP-qPCR-R	AS	TGCTGTCTTTCTTCAGGTTCC	qPCR-SyBR	60	21
h-LC3-qPCR-L	SS	CGCACCTTCGAACAAAGAG	qPCR-SyBR	46	19

<i>h-LC3-qPCR-R</i>	AS	CTCACCCCTTGATCGTCTATTATCA	qPCR-SyBR	49	20
<i>h-18S-qPCR-L</i>	SS	GCAATTATTCCTCCCATGAACG	qPCR-SyBR	60	20
<i>h-18S-qPCR-R</i>	AS	GGGACTTAATCAACGGCAAGC	qPCR-SyBR	59	20
<i>h-ATF4-qPCR-L</i>	SS	TCTCCAGCGACAAGGCTAA	qPCR-SyBR	46	19
<i>h-ATF4-qPCR-R</i>	AS	CAATCTGTCCCGGAGAAGG	qPCR-SyBR	48	19
<i>h-12S-qPCR-L</i>	SS	CCCAGGGTTGGTCAAATTTT	qPCR-SyBR	51	19
<i>h-12S-qPCR-R</i>	AS	CTTTACGCCGGCTTCTATTG	qPCR-SyBR	52	20
<i>h-PSMD11-qPCR-L</i>	SS	AGCTTGCACTTCGGTATGC	qPCR-SyBR	46	19
<i>h-PDMD11-qPCR-R</i>	AS	TAGCCTGAGCCACGCATT	qPCR-SyBR	46	19
<i>h-PSMA2-qPCR-L</i>	SS	GATTGAATATGCTTTGGCTGCT	qPCR-SyBR	46	22
<i>h-PSMA2-qPCR-R</i>	AS	CCACACCATTTGCAGCTTT	qPCR-SyBR	44	19
<i>h-PSMB9-qPCR-L</i>	SS	ACCAACCCGGGACTTACC	qPCR-SyBR	47	18
<i>h-PSMB9-qPCR-R</i>	AS	TCAAACCTCCACTGCCATGAT	qPCR-SyBR	45	20
<i>h-PSME3-qPCR-L</i>	SS	AGCCTTCGGCTCATCATATC	qPCR-SyBR	47	20
<i>h-PSME3-qPCR-R</i>	AS	TTCAGGATCATGTCATGTAGAGTG	qPCR-SyBR	49	24
<i>F-5UTR-bF1 CONS</i>	SS	TTCACCCCAATGGACCTGCCTACTGCAGCGTAGGCCTCGCCTCAACGGCAG GAGAGCAGGGCGGTGCGGTTGCTGCAGCCTTCAGTCTCCACCCGGACTAC	Construcción 5'UTR β-F1	101	100
<i>R-5UTR-bF1 CONS</i>	AS	GTAGTCCGGTGGAGACTGAAAGGCTGCAGCAACCCGAGCCGCTGCTC TCC TGCCGTTGAGCCGAGGCCACGCTGACGTGACAGTAGGCAGGTCCTGGTGAA	Construcción 5'UTR β-F1	101	100
<i>F-5UTR-GAPDH CONS</i>	SS	AATTGAGCCCGCAGCCTCCCGCTCCGCTCTGCTCTCTGCTCCTCTGTCGACAGT CAGCCGCATCTCTTTTGGCTGCCAGCCGAGCCACATCGCTCAGACAC	Construcción 5'UTR GAPDH	101	100
<i>R-5UTR-GAPDH CONS</i>	AS	GTGCTGAGCGGATGTGGCTGGCTGGCGACGCAAAAGAAGATGCGGGCTGA CTGTGGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGAAGCGGGAGGCTGCGGGCTCAATT	Construcción 5'UTR GAPDH	101	100

**Tabla 3. Oligonucleótidos.** Nombre: incluye un nombre resumido del amplicón, la región del molde con la que hibrida (5' ó 3', L o R), el nombre de la diana de restricción, la orientación respecto al molde (F o R) y si se usa para PCR cuantitativa (qPCR). Orientación: respecto al molde (SS, igual orientación; AS, orientación contraria). Secuencia: dirección 5' a 3', diana de restricción en rojo. Utilidad: qPCR, PCR cuantitativa con sonda SYBR green.

### **3.1.5. Radioisótopos.**

Las moléculas marcadas con radioisótopos se compraron a Perkin Elmer (Boston, EE.UU.), se conservaron a 4°C y se usaron durante el periodo de vida media correspondiente (3 meses para <sup>35</sup>S). El que se ha usado en este trabajo es el “Redivue Promix *in vivo* cell labelling mix” para el marcaje metabólico de proteínas y traducción *in vitro*.

### **3.1.6. Drogas.**

Oligomicina, 5- aminoimidazol-4-carboxamida 1-β-D-ribofuranosida (AICAR), cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), N-acetilcisteína (NAC) suministrados por Sigma. Dimetiloxaloliglicina (DMOG) suministrado por Enzo Life Sciences. Torin 1 suministrado por Tocris. MitoQ suministrado por el Dr. Murphy (Universidad de Otago, Dunedin, Nueva Zelanda). MG132 suministrado por Calbiochem.

### **3.1.7. siRNAs.**

Los siRNAs utilizados en este estudio han sido: s1702 (siATF4), s101 (siAMPKα1), s11057 (siAMPKα2), s7485 (sieIF3E), s16491 (sieIF3A), s4578 (sieIF4E), s16500 (sieIF3D). Se utilizó el siRNA de GAPDH (siGAPDH) como control positivo de silenciamiento y un siRNA ineficiente como control negativo de silenciamiento (siControl). Todos se compraron en la casa comercial Ambion/Applied Biosystems.

### **3.1.8. Fluoróforos.**

- Amersham Cy3 Mono-Reactive Dye Pack de GE Healthcare.
- Amersham Cy5 Mono-Reactive Dye Pack de GE Healthcare.

## **3.2. Métodos.**

### **3.2.1. Biología molecular.**

#### **3.2.1.1. Aislamiento de DNA de cultivos bacterianos.**

Las preparación del DNA plasmídico para clonaciones, secuenciación o transfección se realizaron utilizando los kits Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, EE.UU.) o Plasmid MAXI Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

#### **3.2.1.2. Digestión del DNA mediante endonucleasas.**

Los plásmidos y los fragmentos de DNA se digirieron con enzimas de restricción específicas. Las digestiones se llevaron a cabo en los tampones y a las temperaturas recomendados por el fabricante (Roche, Mannheim, Alemania). La purificación de los fragmentos de DNA o los plásmidos digeridos se llevó a cabo utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR clean up system (Promega, Madison, WI, EE.UU.).

### **3.2.1.3. Cuantificación y electroforesis de DNA.**

La cuantificación de DNA se realizó mediante espectrofotometría (Nanodrop ND-1000) y la pureza fue determinada a través del cálculo de los cocientes 260/280 y 260/230. La electroforesis del DNA plasmídico o fragmentos de gran tamaño se realizó en geles de agarosa en tampón TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 2 mM). Para visualizar el DNA o el RNA, el gel se preparó con 5  $\mu$ l de GelRed Nucleic Acid Stain de Biotium. La calibración del tamaño de las moléculas de DNA se realizó mediante fraccionamiento en paralelo de una mezcla de fragmentos de DNA de longitud conocida resultante de la digestión del DNA de los fagos  $\lambda$  y  $\Phi$ 29 con Hind III o usando 1Kb Plus DNA ladder de New England Biolabs.

### **3.2.1.4. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.**

La purificación del DNA de interés se realizó, después de cortar la banda correspondiente, utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR clean up system (Promega, Madison, WI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

### **3.2.1.5. Ligación de fragmentos de DNA.**

Las ligaciones se realizaron en una relación molar 1/3 de vector/inserto durante 5 min a temperatura ambiente con el Quick ligation kit (New England Biolabs, Beverly, MA, EE.UU.).

### **3.2.1.6. Transformación de células *E. coli* competentes.**

Células *E. coli* competentes (100  $\mu$ l) se incubaron con 1ng de plásmido puro o con la mitad de la ligación (50-100ng de vector + inserto) y 5  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol durante 20 min en hielo. A la mezcla se le aplicó un choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se volvió a incubar en hielo durante 2 min. Las células se resuspendieron en 950  $\mu$ l de medio LB y se incubaron durante 1h a 37°C con agitación. Después de esta incubación, se plaquearon 100  $\mu$ l del cultivo bacteriano en placas de LB-agar con el antibiótico adecuado y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

### **3.2.1.7. Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para clonaciones.**

Las amplificaciones por PCR a tiempo final se llevaron a cabo mediante un termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Alemania). Se realizaron con 3,5 U de la Taq polimerasa de alta fidelidad Expand High Fidelity PCR system (Roche, Mannheim, Alemania) usando como molde 10-250 ng de plásmido puro en un volumen final de reacción de 50  $\mu$ l, conteniendo MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,3 mM de cada oligonucleótido y 0,1mM de cada uno de los dNTPs en un tampón suministrado por el fabricante. La T<sub>m</sub> para cada reacción es la del oligonucleótido de T<sub>m</sub> más baja de la pareja (Tabla 3) y el tiempo de elongación 1 min/kb. Protocolo: 1 ciclo de desnaturalización inicial (2min, 94°C), 10 ciclos



de amplificación (15seg, 94°C, 30seg de anillamiento, elongación a 72°C), 20 ciclos de amplificación en los que añade 5seg de tiempo de elongación por cada ciclo sucesivo y elongación final (7min, 72°C).

### **3.2.1.8. RT-PCR.**

Para la producción de cDNA a partir de RNA se usó el kit de transcripción inversa de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU.). En esta reacción se usó como molde 1 µg de RNA puro y no degradado en un volumen de reacción de 20 µl que contiene: 2 µl de tampón RT 10X, 0.8 µl de la mezcla de dNTPs (100 mM), 2 µl de hexámeros con secuencias al azar 10X, 1 µl de inhibidor de RNAasa (20 U/µl) y 1 µl de la transcriptasa en reverso (50 U/µl). Como control siempre se realizó una reacción poniendo 1µl de agua en lugar de la transcriptasa en reverso (RT-). Se realizó el siguiente protocolo: anillamiento y extensión (10min, 25°C), transcripción reversa (120min, 37°C) y desnaturalización (5min, 85°C).

### **3.2.1.9. PCR cuantitativa (qPCR).**

Las amplificaciones a tiempo real (qPCR) en capilares se llevaron a cabo en un termociclador LightCycler Systems for Real-Time PCR (Roche, Mannheim, Alemania). Las amplificaciones a tiempo real en placa se llevaron a cabo en el ABI PRISM 7900HT SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

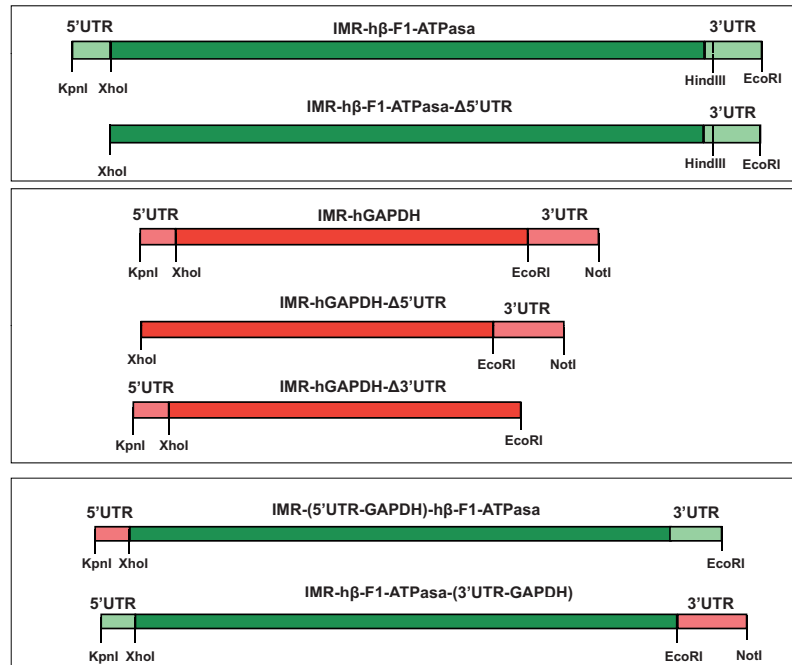
Las reacciones de PCR en tiempo real con la sonda SYBR Green de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU.) se realizaron a partir de 5 ng de cDNA en un volumen final de 10 µl conteniendo la SYBR Master mix 1X complementada con 0,5 µM de cada oligonucleótido en el caso de las qPCR en capilares y 0,25 µM de cada oligonucleótido en el caso de las qPCR en placa. El protocolo consistió en un ciclo de desnaturalización inicial (10 min 95°C) para activar la enzima, 40 ciclos de amplificación (15 seg, 95°C de desnaturalización; 20 seg, 60°C de anillamiento y 20 seg, 72°C de extensión y adquisición de fluorescencia) y un paso final de aumento gradual de la temperatura (0,1°C/seg) hasta 95°C (melting curve).

### **3.2.1.10. Cuantificación del número de copias del DNA mitocondrial.**

La estimación de la cantidad de DNA mitocondrial se realizó mediante la cuantificación relativa de un gen del mtDNA relativa a la de un gen nuclear ( $\beta$ -F1-ATPasa). El DNA molde se obtuvo a partir de una preparación de DNA total extraída a partir de placas de 35 mm de diámetro con el kit High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación relativa se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa (3.2.1.9). Los oligonucleótidos utilizados fueron: 12S-L y 12S-R para el mtDNA y h $\beta$ -L y h $\beta$ -R para el DNA nuclear (las secuencias se encuentran en la tabla 3). La cuantificación relativa se realizó mediante el método 2- $\Delta\Delta$ Ct (Livak y Schmittgen, 2001) y se usó el ratio 12S/h $\beta$  para comparar las muestras.

### 3.2.1.11. Clonaciones.

Todas las secuencias de las construcciones que se detallan a continuación fueron verificadas por el servicio de secuenciación de la UAM o de CWRU.



**Figura 8. Representación esquemática de los clones realizados.** Los fragmentos se purificaron, se digirieron con las enzimas de restricción indicadas en la figura y se ligaron al vector pBLuescript II SK (+) digerido previamente con las mismas enzimas. El procedimiento detallado se encuentra en la sección 3.2.1.11 de materiales y métodos.

Los 5'UTR fueron sintetizados *in vitro*, como se indica a continuación. Se pidieron oligonucleótidos sentido y antisentido de 100 pares de bases, correspondientes a toda la región del 5'UTR de β-F1-ATPasa y de GAPDH. Cada par de oligonucleótidos se incubó a 95°C en una relación equimolar durante 5-10 min. Transcurrido este tiempo, la mezcla se dejó enfriar poco a poco durante 45-50 min. Posteriormente se llevó a cabo la amplificación de los 5'UTR por PCR usando oligonucleótidos diseñados con las enzimas de restricción de interés. Los fragmentos se purificaron, se digirieron con KpnI y XhoI y se ligaron al vector pBLuescript II SK (+) digerido previamente con las mismas enzimas. Tras comprobar por secuenciación que esta primera clonación estaba bien, los plásmidos generados se digirieron con XhoI y EcoRI para proceder con la segunda clonación. La región codificante de β-F1-ATPasa, el fragmento correspondiente a la región codificante y el 3'UTR de β-F1-ATPasa y la región codificante de GAPDH necesarias para la clonación fueron amplificadas por PCR partiendo de los vectores pBS-β-F1(h) y pQE-GAPDH de nuestro laboratorio (Acebo y cols., 2009; Willers y cols., 2010), usando los oligos que se indican en la tabla 3. Estos

fragmentos fueron digeridos con las enzimas XhoI y EcoRI y se ligaron en los vectores pBLuescript II SK (+) vacíos (para realizar la clonación de los plámidos  $\Delta$ 5'UTR) o que contienen los 5'UTR previamente digeridos con las mismas enzimas. La secuencia 3'UTR del mRNA de GAPDH se amplificó por PCR usando como molde cDNA y los oligos que se indican en la tabla 3. Se insertó en el vector pBLuescript II SK (+) que contiene el 5'UTR y la región codificante de GAPDH y en el vector pBLuescript II SK (+) que contiene el 5'UTR de  $\beta$ -F1-ATPasa y la región codificante de GAPDH en los sitios EcoRI y NotI. En todos los casos se hicieron glicerolados (glicerol al 20%) para mantener los plámidos a  $-70^{\circ}\text{C}$ . En la figura 8 se puede observar una representación esquemática de los clones que se realizaron.

### **3.2.2. Métodos de Bioquímica.**

#### **3.2.2.1. Extracción de DNA genómico, RNA y proteína de cultivos celulares.**

Las células se lavaron dos veces con PBS y se despegaron de la placa mediante rascado de la placa o por tratamiento con una solución 0,25% Tripsina-0,02% EDTA, retirando inmediatamente esta solución y dejando 3 min en el incubador. Posteriormente, se añadió PBS para recoger las células de la placa obteniendo una suspensión de células que se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . A continuación, el sedimento de células obtenido se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  del solución de lisis pH 8.0 (Hepes 25mM, EDTA 2.5 mM, Triton X-100 1%, PMSF 1 mM, leupeptin 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e inhibidores de proteasas y fosfatasas) por cada 4 millones de células y se mantuvieron en hielo durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron durante 15 min a 11.000xg a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se usó tanto para el análisis de proteínas como para extraer RNA citoplasmático con el kit RNeasy (QIAGEN). La extracción de DNA genómico se llevó a cabo con el kit High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **3.2.2.2. Extracción de factores de transcripción de cultivos celulares.**

Para la extracción de factores de transcripción se utilizó el kit comercial Nuclear Extraction Kit de Signosis Biosignal Capture (Sunnyvale, CA, EE.UU). Se plaquearon 2,5 millones de células en placas p100. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células se lavaron con PBS 1X. A continuación se añadió 1 ml de una mezcla previamente preparada y que contiene 1ml de tampón I 1X suministrado por el fabricante, 10  $\mu\text{l}$  de DTT, y 10  $\mu\text{l}$  de inhibidores de proteasas. La placa se puso en hielo y se agitó a 200 rpm durante 10 min en una plataforma agitadora. Pasados estos 10 min, se levantaron las células mediante rascado de la placa. Una vez levantadas, se transfirieron a un tubo de 1,5 ml y se centrifugaron a 10.000xg durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante, apurando al máximo para no dejar restos que pudieran interferir en los pasos posteriores. Los sedimentos celulares se mantuvieron en hielo en todo momento. Se añadió 250  $\mu\text{l}$  de una mezcla previamente preparada que contenía 1 ml de tampón II suministrado por el fabricante, 10  $\mu\text{l}$  de DTT, y

10 µl de inhibidores de proteasas al sedimento celular, sin tratar de resuspenderlo. El tubo se puso en hielo y se agitó a 200 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante, que es ya el extracto nuclear que nos interesa, se transfirió a un nuevo tubo y se determinó la cantidad de proteína mediante el reactivo de Bradford (3.2.2.4).

### **3.2.2.3. Extracción de factores de iniciación de la traducción de cultivos celulares.**

Se plaquearon 2 millones de células en placas p150. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se recogieron las células. El sedimento celular se resuspendió en un volumen de 500 µl de una solución que contiene (Tris-HCl p.H 7.6 20 mM, sacarosa 200 mM, NH<sub>4</sub>Cl 100 mM, acetato de magnesio 5 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM y PMSF 1 mM). Se hizo una primera centrifugación a 27.000xg durante 30 min. Después se centrifugó el sobrenadante a 100.000xg durante 150 min a 4°C para obtener las fracciones microsomal (sedimento) y post-microsomal (sobrenadante). El sedimento microsomal se resuspendió en 500 µl de una solución homogenizadora que contiene (Tris-HCl p.H 7.6 20 mM, sacarosa 200 mM, NH<sub>4</sub>Cl 100 mM, cloruro de potasio 0.5 M, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM y PMSF 1 mM) en agitación durante 90 min. Después se centrifugó a 100.000xg durante 180 min para recuperar el sobrenadante que es la fracción que contiene los factores de iniciación de la traducción. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se determinó la cantidad de proteína mediante el reactivo de Bradford (3.2.2.4).

### **3.2.2.4. Cuantificación de proteínas.**

La cantidad de proteína total de los extractos biológicos se determinó mediante el reactivo de Bradford (BioRad, Hercules, CA, EE.UU) siguiendo las recomendaciones del fabricante usando una solución de concentración conocida de BSA como patrón de referencia.

### **3.2.2.5. Marcaje de proteínas con los fluoróforos cy3 y cy5.**

Se marcaron 75 µg de proteína con los distintos fluoróforos (3,75 µl) previamente reconstituidos durante 30 min a temperatura ambiente. Cada 10 min se homogeneizó bien la mezcla para asegurar un buen marcaje. Se llevó a cabo la separación de las proteínas marcadas del exceso de fluoróforo mediante cromatografía de exclusión molecular usando columnas previamente equilibradas.

### **3.2.2.6. Electroforesis de proteínas mono (SDS-PAGE) y bi-dimensional (IEF-SDS-PAGE).**

Las proteínas se fraccionaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS según el método descrito por Laemmli (Sambrook y Russell, 2001). Los extractos proteicos se mezclaron con el tampón de carga de Laemmli y se hirvieron a 95°C durante 5 min antes de cargar el gel. La calibración de la movilidad de las proteínas en los geles se efectuó mediante electroforesis en paralelo de un conjunto de proteínas teñidas

de peso molecular conocido: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24, 17 y 12 kDa (Rainbow markers, GE Healthcare, Waukesha, WI, EE.UU.).

Para la electroforesis en dos dimensiones, las muestras se diluyeron en 200 µl de solución de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 20%, mezcla de anfolitos comercial rango de pH 4-7 (Pharmalyte 4-7, GE Healthcare), EDTA 0,5 mM, DTT 65 mM, azul bromofenol 0,002%, PMSF 0,1mM e inhibidores de proteasas (Complete Mini EDTA-free, Roche)) y se dejaron en contacto con tiras de acrilamida con un gradiente de pH 4-7 inmovilizado (IPG strips 4-7, GE Healthcare) durante 22 h 45 min. El enfoque de las proteínas en el gradiente de pH (1ª dimensión) se realizó durante 5 h a 30 V, 5 h a 60 V, 1 h a 120 V, 1 h a 500 V, 30 min a 1000 V, 30 min hasta 8000 V en gradiente fijando la potencia a 50000 V y finalmente 30 min a 500 V. Las tiras se conservaron a -80°C hasta que se realizó la segunda dimensión. Antes de realizar la segunda dimensión las tiras se equilibraron 15 min en 10 ml de solución de equilibrado (Tris 50 mM pH 8,8, SDS 2%, urea 6M, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%) con 100 mg de DTT y otros 15 min en 10 ml de solución de equilibrado con 250 mg de yodo-acetamida. La segunda dimensión se realizó en geles de acrilamida (12%) de 13 cm sin gel concentrador en condiciones desnaturizantes fijando la corriente a 20 mA a 4°C.

### **3.2.2.7. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.**

Las proteínas resueltas en geles de poliacrilamida se visualizaron por tinción con AgNO<sub>3</sub> o con azul de Coomassie. La tinción con azul de Coomassie se llevó a cabo incubando el gel 2-3h en solución de tinción (Metanol 40%, Acético 10%, Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2% p/v) y haciendo 3-6 incubaciones de 10 min en solución de destinción (Metanol 25%, Acético 10%), una incubación 12-48h a 4°C con solución de destinción lenta (Metanol 5%, Acético 7,5%) y conservándolo finalmente en solución de almacenamiento (Acético 1%) a 4°C. La tinción con AgNO<sub>3</sub> se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo: (i) fijación, 30 min con metanol 50% (ii) sensibilización, 30 min CuCl<sub>2</sub> 2%, KMnO<sub>4</sub> 0.01%; lavados, 3 de 5 min con etanol 10%, acético 5%; (iii) reacción con plata, 15 min AgNO<sub>3</sub> 0.1% protegido de la luz; lavados, 2 de 1 min con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, HCHO 0,04%; (iv) revelado con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, HCHO 0,04%; (v) parada, 10 min con acético 10%. Finalmente se puso en solución de almacenamiento y se conservó a 4°C. Todas las soluciones se prepararon en el momento con agua milliQ.

### **3.2.2.8. Identificación de proteínas por espectrometría de masas.**

La secuenciación de proteínas se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) de Madrid. Después de los tratamientos celulares, se recogieron las células y se llevó a cabo la purificación de factores de iniciación de la traducción (3.2.2.3.). A partir de estos extractos se realizó la digestión en solución. Las proteínas se desnaturizaron con urea 8M, y los puentes disulfuro de los residuos

de cisteínas se redujeron con ditioneitol (DTT) 10 mM durante 1h a 37°C. Después los grupos tiol se alquilaron con iodoacetamida 50 mM durante 1h a temperatura ambiente en oscuridad. Las muestras se diluyeron para reducir la concentración de urea hasta 1.4 M y se digirieron usando tripsina de alta calidad para secuenciación (Promega, Madison, WI, EE.UU.) durante toda la noche a 37°C en una proporción de 1:20 (peso/peso) tripsina: proteína (Villar y cols., 2006). La digestión se paró añadiendo ácido trifluoroacético al 1%. Todos los sobrenadantes se liofilizaron y desalaron usando puntas OMIX C18 (Varian) usando como solución para eluir acetonitrilo (ACN) al 50% en ácido trifluoroacético al 0,1%. Las muestras se volvieron a liofilizar hasta el análisis por espectrometría de masas. Las proteínas digeridas y liofilizadas, se resuspendieron en 9 µl de ácido fórmico al 0,1% para el análisis por cromatografía en fase reversa (RP-LC-MS/MS) mediante el modo de exclusión dinámica en un sistema Agilent 1100 acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica lineal LTQ-Velos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU). Los péptidos se separaron por cromatografía en fase reversa usando una columna Bio-Basic C18 RP (Thermo Fisher Scientific) de 0.18 mm × 150 mm, que opera a 2.0 µl/min. Los péptidos se eluyeron usando un gradiente de 100 min del 5 al 40% en un solvente que contiene ácido fórmico y acetonitrilo diluidos en agua al 0.1% y 80% respectivamente. La ionización por electrospray (ESI) se hizo utilizando un micro-spray con una interfase Metal Needle-Kit (Thermo Fisher Scientific). Los péptidos se identificaron mediante full scans de 400 a 1600 amu (1 µscans), seguidos de 15 MS/MS. Los parámetros utilizados fueron los siguientes: anchura de aislamiento de 2 U (unidades de relación masa/carga), energía de colisión normalizada al 35% y exclusión dinámica aplicada durante períodos de 30 segundos. La identificación de péptidos a partir de los datos en bruto se llevó a cabo utilizando el algoritmo SEQUEST (Bioworks Browser 3.2, Thermo Fisher Scientific). La base de datos utilizada en la búsqueda fue Homo, descargada del Protein Knowledgebase (UniProtKB) <http://www.uniprot.org>. La utilización de tripsina genera cortes trípticos después de Arg y Lys, en la búsqueda se restringe estas pérdidas de corte a 2, la tolerancia del ión precursor es de 1 Da y de 0.8 para fragmentos MS/MS; se introduce como modificación variable la oxidación de Met y como modificación fija la carbamidometilación de Cys.

### **3.2.2.9. Fluorografía de proteínas marcadas en geles de poliacrilamida.**

La detección de proteínas marcadas con emisores β de baja energía [<sup>35</sup>S] se efectuó mediante fluorografía utilizando como fluoróforo el ión salicilato (Sambrook y Russell, 2001). Brevemente, el gel se incubó durante 30 min con medio de fijación (ácido acético 10%, isopropanol 25%) y se lavó posteriormente dos veces con agua destilada durante 15 min. A continuación, el gel se incubó durante 1h en salicilato sódico 1 M y se secó mediante vacío y calor. El gel seco se expuso a películas autorradiográficas a -70°C.

Antígeno	Peso Molecular	Origen	Productor	Utilidad/ Dilución
20S Proteasome	36 Kda	Conejo	Enzo Life Sciences	WB (1:1,000)
4EBP1	20 Kda	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
Akt	60 KDa	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
AMPK	62 KDa	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
ATF4	39 Kda	Conejo	Santa Cruz	WB (1:500)
Bax	30 Kda	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
Bcl2	25 Kda	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
Bcl-xl	26 Kda	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
Catalasa	60 Kda	Conejo	Sigma	WB (1:500)
COX I	39 Kda	Ratón	Molecular Probe	WB (1:150)
COX IV	19 Kda	Ratón	Invitrogene	WB (1:250)
eIF2 $\alpha$	38 KDa	Conejo	Santa Cruz	WB (1:1,000)
eIF3A	166 Kda	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
eIF3D	64 Kda	Conejo	Acris	WB (1:1,000)
eIF3E	48 Kda	Conejo	Sigma	WB (1:1,000)
eIF4E	25 Kda	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
GAPDH	36 Kda	Ratón	Abcam / (Acebo <i>et al.</i> , 2009)	WB (1:20,000)/IP (1:50)
GCN2	220 Kda	Conejo	Juanjo Berlanga	WB (1:2,000)
GRK2	80 KDa	Conejo	Santa Cruz	WB (1:500)
HIF-1 $\alpha$	132 Kda	Conejo	Santa Cruz	WB (1:200)
Hsp60	60 Kda	Ratón	Stressgen / (Acebo <i>et al.</i> , 2009)	WB (1:5,000)/IP (1:50)
HuR	35 KDa	Ratón	Santa Cruz	WB (1:200)
LC3	12-17 KDa	Conejo	Sigma	WB (1:500)/Immuno (1:100)
mTOR	289 Kda	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
Myc	38 Kda	Ratón	Roche Applied Science	WB (1:1,000)
p38 MAPK	43 KDa	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
p-4EBP1 (Ser 65)	15-20 Kda	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
p53	53 KDa	Conejo	Santa Cruz	WB (1:200)
p62	62 Kda	Conejo	Enzo Life Sciences	WB (1:1,000)

p70S6K	70 Kda	Conejo	Santa Cruz	WB (1:1,000)
p-ACC (Ser 79)	280 kDa	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
p-Akt (Ser 473)	60 KDa	Ratón	Cell signaling	WB (1:1,000)
p-AMPK (Thr 172)	62 KDa	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
p-EIF2 $\alpha$ (Ser 51)	38 KDa	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
PGC-1 $\alpha$	93 KDa	Conejo	Santa Cruz	WB (1:250)
p-GCN2	220 Kda	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
PK	58 Kda	Cabra/Ratón	Abcam / (Acebo <i>et al.</i> , 2009)	WB (1:1,000)/IP (1:50)
p-mTOR (Ser 2448)	289 KDa	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
p-p38 MAPK (Thr 180/ Tyr 182)	43 KDa	Ratón	Cell signaling	WB (1:1,000)
p-p70S6K	70 Kda	Ratón	Cell signaling	WB (1:1,000)
p-Raptor (Ser 792)	150 Kda	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
p-Rb (Ser 608)	110 Kda	Cabra	Santa Cruz	WB (1:200)
p-S6 (Ser 235/236)	32 Kda	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
p-ULK1 (Ser 555)	140 Kda	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
p-ULK1 (Ser 757)	140 Kda	Conejo	Cell signaling	WB (1:1,000)
PyrDH	41 Kda	Ratón	Invitrogene	WB (1:500)
Rb	110 Kda	Conejo	Santa Cruz	WB (1:200)
SDH	30 Kda	Ratón	Invitrogene	WB (1:500)
SOD1	16 Kda	Conejo	Santa Cruz	WB (1:1,000)
SOD2	25 Kda	Conejo	Abcam	WB (1:1,000)
$\alpha$ -F1-ATPase	56 Kda	Ratón	Molecular Probe	WB (1:1,000)
$\alpha$ -tubulina	50 KDa	Ratón	Sigma	WB (1:1,000)
$\beta$ -Actin	42 KDa	Ratón	Sigma	WB (1:10,000)
$\beta$ -Catenina	92 Kda	Ratón	BD Biosciences	WB (1:500)
$\beta$ -F1-ATPase	52 Kda	Conejo/Ratón	(Cuezva <i>et al.</i> , 2002; Acebo <i>et al.</i> , 2009)	WB (1:40,000)/IP (1:50)

**Tabla 4. Anticuerpos empleados en este trabajo.** En la tabla se indica el antígeno que reconoce el anticuerpo, el peso molecular aparente que muestra en SDS-PAGE, el origen del anticuerpo, la compañía donde fue adquirido o en su caso el laboratorio donde fue generado, así como la utilidad que se les ha dado en esta tesis y la dilución empleada. WB, *western blot*; Inmuno, microscopía de inmunofluorescencia; IP, inmunoprecipitación.



### **3.2.2.10. Detección inmunológica de proteínas (*Western blot*).**

Las proteínas fraccionadas en geles monodimensionales se transfirieron a membranas de PVDF o nitrocelulosa mediante electro-transferencia húmeda. La transferencia se efectuó a 100V durante 45 min en tampón de transferencia (Glicina 39 mM, Tris-HCl 48 mM, metanol 20% (v/v)) utilizando un equipo Mini Trans Blot de Bio-Rad. A continuación las membranas se incubaron en solución de bloqueo (leche desnatada liofilizada al 5% p/v diluida en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) más 0,1% Tween-20) durante al menos 1h con agitación y a temperatura ambiente. La incubación de la membrana con el anticuerpo se efectuó a temperatura ambiente durante 1h o durante toda la noche a 4°C, dependiendo del anticuerpo. Los anticuerpos fueron diluidos en TBS más albúmina bovina al 3% o al 5% según el anticuerpo y  $\text{NaN}_3$  1 mM. Los anticuerpos usados en esta tesis y las diluciones están resumidos en la Tabla 4. A continuación, las membranas se lavaron 1 vez durante 10 min y 2 veces durante 5 min con TBS-Tween (0,1%). Posteriormente las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra contra la región Fc de las IgGs de conejo, o de un anticuerpo de conejo contra la región Fc de las IgGs de ratón o de cabra, dependiendo del anticuerpo primario utilizado, conjugados ambos a peroxidasa (Nordic Immunology, 1:5.000). Las proteínas inmunoreactivas se visualizaron utilizando el método quimioluminiscente del ECL (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la intensidad de las bandas resultantes que estaban dentro del rango lineal de la película se determinó utilizando el software Kodak Digital Science 1D.

### **3.2.2.11. Transcripción *in vitro*.**

Para los experimentos de traducción *in vitro*, el RNA se transcribió *in vitro* usando el kit MEGAscript (Ambion, Austin, TX, EE.UU.) usando 1  $\mu\text{g}$  de plásmido linearizado durante 3h a 37°C siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido se purificó por precipitación con LiCl o por extracción con fenol/cloroformo. En el caso de que el RNA sintetizado se fuera a usar posteriormente en ensayos de traducción *in vitro* (3.2.2.12) se incluyó análogo de cap o ARCA cap (Ambion) en la transcripción a una concentración de 6 mM. La cuantificación de RNA se realizó mediante espectrofotometría (Nanodrop ND-1000) y la pureza fue determinada a través del cálculo de los cocientes 260/280 y 260/230.

### **3.2.2.12. Traducción *in vitro*.**

Los ensayos de traducción *in vitro* se realizaron mediante la adición de un lisado de reticulocitos de conejo que contiene la maquinaria y los factores necesarios para la traducción de un RNA añadido (Promega). En todos los casos se tituló la cantidad de mRNA necesario para una traducción eficiente. Para cada ensayo se empleó mRNA transcrito *in vitro* en presencia de análogo de cap o ARCA cap (secc. 3.2.2.11), 1.6  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  de [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina (Perkin Elmer), e inhibidores de RNAsas (Promega), en un volumen final de 15

µl. La mezcla se incubó 40-60 min a 30°C y los productos sintetizados se resolvieron por SDS-PAGE (3.2.2.6) y el gel se sometió posteriormente a fijación (3.2.2.7) y fluorografía (3.2.2.9). Los factores de iniciación de la traducción que se añadieron a las reacciones, eIF2 y eIF4F, así como los inhibidores de estos factores, dsRNA y m7GDP respectivamente, fueron suministrados por el grupo del Dr. William Merrick (Grifo y cols., 1982; Grifo y cols., 1983).

### **3.2.3. Biología celular**

#### **3.2.3.1. Mantenimiento de líneas celulares establecidas en cultivo.**

Se han usado células de carcinoma colorrectal humano HCT116. La línea celular HCT116 se cultivó en McCoy's 5A suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml y aminoácidos no esenciales 400 µM (Ala, Asn, Asp, Glu y Pro). La línea celular se mantuvo en incubadores a 37°C con 7% CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad. Para la conservación de las líneas se congelaron de forma gradual (14h a -20°C y 24h a -70°C antes de ser conservadas en N<sub>2</sub> líquido) en alícuotas de 5 millones de células con no más de 3 pases acumulados en 1ml del medio de cultivo con DMSO al 5%. La descongelación de estos viales se realizó a 37°C diluyéndolas inmediatamente en medio de cultivo y centrifugándolas antes de ponerlas a crecer.

#### **3.2.3.2. Tratamientos celulares.**

Según la necesidad experimental, las células han sido tratadas con 6 µM de oligomicina (OL) (células de fenotipo G) durante 48 h, siempre teniendo como control células sin tratar a las que llamamos células M. Las células han sido tratadas también con 200 µM de cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) durante 6h, 40 µM de MG132 durante 8h, 1 mM de DMOG y 250 nM de Torin 1 durante 24h, 0,1 mM de AICAR, 40-50 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 nM de MitoQ y 500 µM de NAC durante 48h. El tratamiento con OL, AICAR, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MitoQ y NAC se repuso cada 24h.

#### **3.2.3.3. Transfección transitoria de plásmidos y de siRNAs.**

Para la transfección de plásmidos en células eucarióticas se utilizaron preparaciones de alto grado de pureza y filtrados (0,2 µm, Millipore). En estos experimentos se utilizaron los reactivos Plus y Lipofectamina (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando siempre como control de transfección el plásmido CDL-pβ-GFP-β-3'UTR (Martinez-Diez y cols., 2006) que codifica la proteína fluorescente GFP en una relación de 1:10, plásmido control: plásmido de interés. De forma rutinaria, se mantuvo el medio de cultivo con los complejos liposoma catiónico-DNA en contacto con las células durante dos horas, se cambió el medio y se analizó el fenotipo 48h post-transfección. En el caso de los siRNAs, éstos se transfectaron en el momento en que se plaquearon, utilizando el reactivo siPORT NeoFx (Ambion/Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En este caso el medio se cambió 24h post-transfección y se analizó el fenotipo 48h-72h post-transfección. Los siRNAs se transfectaron a una concentración final de 30 nM.

#### **3.2.3.4. Microscopía electrónica.**

Inclusión convencional en Epon: las células se fijaron en 2% de glutaraldehído en tampón Sörensen Na/K 0.1M pH 7,4 durante 2h a temperatura ambiente. A continuación, se retiró el fijador y se lavó la placa tres veces con tampón fosfato Na/K pH 7.4. Las células se obtuvieron mediante raspado de la placa de cultivo tras el último lavado añadiendo el volumen apropiado de tampón. La suspensión celular se centrifugó a 3.000xg durante 5 min y el sedimento celular se lavó con PBS y posteriormente se fijó con 1% OsO<sub>4</sub> (tetróxido de osmio) y 1% K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> (ferrocianuro potásico) durante 60 min. A continuación, las células se deshidrataron con etanol y se embebieron en Epon (resina TAAB 812, TAAB Laboratories Equipment Limited) siguiendo los protocolos estándar. Se obtuvieron criosecciones ultrafinas, de 70-80 nm de espesor, a -120°C en ultramicrotomo LeicaUCT (Leica microsystems). Los cortes se recogieron en gradillas de cobre cubiertas de carbono coloidal, se tiñieron con 2 % acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron a 80 kV en un microscopio electrónico Jeol 1010 (Tokyo, Japan).

Procesamiento y cuantificación de imágenes: el análisis de las imágenes adquiridas se realizó con el programa Image J (Image processing and analysis in Java). El cálculo de la “longitud relativa de las crestas” se llevó a cabo en imágenes digitales midiendo la longitud de las crestas respecto a la sección transversal de las mitocondrias en píxeles. La misma herramienta informática se usó para la conversión de las medidas en píxeles en unidades de longitud ( $\mu\text{m}$ ).

#### **3.2.3.5. Microscopía de fluorescencia.**

La microscopía de fluorescencia para ver la morfología mitocondrial se realizó con células HCT116 que expresan de forma estable la proteína fluorescente GFP en la mitocondria. Después de realizar el tratamiento con OL durante 48h (fenotipo G), teniendo como control células sin tratar (fenotipo M), la expresión de GFP se observó directamente en las placas de cultivo en microscopio de barrido láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss). Para los experimentos de inmunofluorescencia con el objetivo de ver activación de la vía de la autofagia, las células HCT116 se sembraron en cubreobjetos estériles previamente cubiertos 12h con poli-lisina y se realizaron los tratamientos correspondientes. Las células se fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 20 min. Se utilizó el anticuerpo anti-LC3 de Sigma, a una dilución (1:100), ya que LC3 es un marcador de formación de autofagosomas. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, la fluorescencia celular se analizó usando el mismo microscopio con un objetivo de 63x.

### **3.2.3.6. Marcaje metabólico de proteínas en células en cultivo.**

Células tratadas o no tratadas al 70 % de confluencia se incubaron 20 min en medio de cultivo sin metionina ni cisteína. Tras esta incubación se retiró este medio y se añadió el medio de marcaje (medio de cultivo sin metionina ni cisteína y 0.65 mCi/ml de Promix (3.1.5) y se dejó incubando 40 min.

### **3.2.3.7. Velocidad de síntesis de proteínas *in vivo*.**

Tras realizar un marcaje metabólico de corta duración de las proteínas (3.2.3.6), se lavaron inmediatamente las células con PBS frío, se tripsinizaron, se recogieron, se lisaron en tampón RIPA (Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, NaCl 0,5 M, Tritón X-100 2%, desoxicolato sódico 1 %, SDS 0,2%) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Mini EDTA-free, Roche) y se congeló y descongeló tres veces en N<sub>2</sub> líquido para favorecer la lisis celular. Rutinariamente, se usó un pocillo de una placa p6 por cada punto. Se determinó la cantidad de proteína de los extractos (3.2.2.4) y la incorporación de [<sup>35</sup>S]-metionina. Para calcular la incorporación de aminoácidos marcados sobre el conjunto de proteína celular, cada muestra se precipitó con ácido tri-cloro-acético y se contó la radiactividad presente exclusivamente en el precipitado de proteínas. Brevemente, a 2 µl de extracto se le añadieron 20 µl de SDS 0,5%, 50 µl de BSA 2 mg/ml y 2 ml de ácido tri-cloro-acético al 15%, Met 1 mM y se dejaron precipitar las proteínas 1h en hielo. La mezcla se pasó a través de filtros GF/C que se lavaron con ácido tri-cloro-acético al 5%, se secaron con etanol y se sumergieron en líquido de centelleo (Hi SafeII, GE Healthcare) antes de realizar el conteo. La cantidad de [<sup>35</sup>S]-metionina incorporada se normalizó por los µg de proteína en cada muestra. Se fraccionaron 10 µg de proteína total marcada con [<sup>35</sup>S]-metionina en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS (9%) más 4M de Urea. Para analizar la cantidad de proteína sintetizada durante el periodo de marcaje se procedió a la inmunoprecipitación de la proteína de interés partiendo de unos 100 µg de proteína total (3.2.3.9).

### **3.2.3.8. Estudio del recambio de proteínas mediante pulso y caza.**

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento en cada condición experimental, para el pulso y caza se hizo un marcaje metabólico (3.2.3.6) con [<sup>35</sup>S]-metionina durante 1 h. Tras el marcaje, las células se lavaron tres veces con medio normal para quitar los restos de [<sup>35</sup>S]-metionina y en este momento se recogieron las células a tiempo cero (t<sub>0</sub>). Para los demás tiempos, las células se dejaron incubando en medio completo suplementado con metionina y cisteína 5 mM y se reemplazaron los tratamientos correspondientes. En los tiempos indicados, se recogieron las células con tripsina y se inmunoprecipitaron las proteínas de interés partiendo de unos 100 µg de proteína total (3.2.3.9). Para calcular la vida media de las proteínas, se llevó a cabo la densitometría de las bandas y la media de cada tiempo se normalizó por la media del tiempo 0h donde la cantidad de proteína es máxima. Se representó en una recta el ln de las bandas normalizadas frente al tiempo y la vida media se

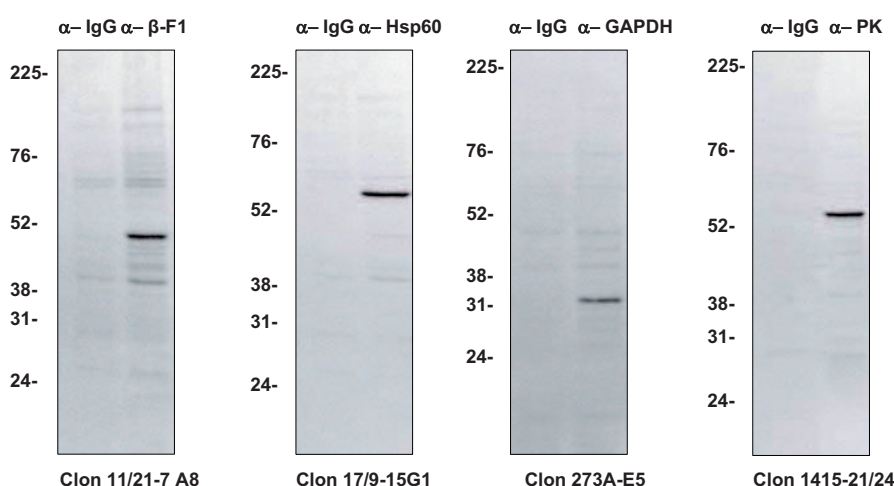
calculó mediante la fórmula:

$$t_{1/2}: 0.693/Kd$$

donde  $Kd$ , es la constante de degradación que se corresponde con la pendiente de la recta.

### 3.2.3.9. Inmunoprecipitación (IP).

En primer lugar se realizó el recubrimiento de la resina de proteína G sepharosa (Sigma) con el anticuerpo. Para ello, se incubaron 10  $\mu$ l de resina por punto, previamente hinchada y equilibrada, con 6-7.5  $\mu$ g de IgGs de los siguientes anticuerpos monoclonales producidos en nuestro laboratorio (Tabla 4) (Acebo y cols., 2009): anti-Hsp60 (clon 17/9-15 G1), anti- $\beta$ -F1-ATPase (clon 11/21-7 A8), anti-PK (clon 1415-21/24) o anti-GAPDH (clon 273A-E5) en 1 ml de tampón RIPA (3.2.3.7) suplementado con 5 mg de BSA durante toda la noche a 4°C. También se preparó resina incubada con IgGs de ratón no específicas como control de inmunoprecipitación. Posteriormente, se lavó la resina tres veces con RIPA. La resina con el anticuerpo inmovilizado se conservó a 4°C hasta 15 días en RIPA con Na<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> 0,02%. Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo partiendo de 100  $\mu$ g de proteína total de los extractos celulares diluidos en RIPA y se les añadió 10  $\mu$ l de resina cubierta de anticuerpo hasta un volumen final de 300  $\mu$ l y se les dejó incubar al menos 1h a 4°C en la noria. Posteriormente, se lavó la resina 5 veces con 1 ml de RIPA sin apurar el precipitado y finalmente, una vez con una solución Tris 15 mM pH 7.5, NaCl 10 mM dejando seca la resina. La resina se eluyó con tampón Laemmly de electroforesis (Sambrook y Russell, 2001; Acebo y cols., 2009) 10 min a 95°C, se centrifugó a 12.000xg y se analizó el material inmunoprecipitado mediante fraccionamiento en gel (3.2.2.6) y subsiguiente fluorografía (3.2.2.9). En la figura 9 se muestra un ejemplo de inmunoprecipitaciones realizadas con los anticuerpos monoclonales nombrados.



**Figura 9. Anticuerpos monoclonales utilizados para la inmunoprecipitación de proteínas.** En la figura se muestran ejemplos representativos de la inmunoprecipitación de las proteínas  $\beta$ -F1, Hsp60, GAPDH y PK. Debajo de cada imagen se indica el clon utilizado de cada uno de los anticuerpos monoclonales. pi: inmunoprecipitados con IgGs inespecíficas de ratón. En la parte izquierda de cada inmunoprecipitación se indica el peso molecular en kDa.

### **3.2.3.10. Análisis de la activación de factores de transcripción.**

El array para el análisis de la activación de factores de transcripción se llevó a cabo mediante un kit que permite el estudio simultáneo de la activación de 48 factores de transcripción (Signosis Biosignal Capture, Sunnyvale, CA, EE.UU). En primer lugar se hizo la formación de complejos DNA-factores de transcripción. Para ello se mezclaron 5 µg de extractos nucleares (3.2.2.2) con 2 µl de la mezcla de sondas marcadas con biotina y 10 µl de solución de unión suministradas por el fabricante. La reacción se hizo en un volumen final de 20 µl y se incubó durante 30 min a 16°C en un termociclador. A continuación se separaron los complejos formados de las sondas que han quedado libres por cromatografía de exclusión molecular usando columnas previamente equilibradas. Las sondas que se unieron a los factores de transcripción se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min para separar los complejos y se transfirieron inmediatamente al hielo para comenzar la hibridación en placa que se llevó a cabo durante toda la noche a 42°C. Al día siguiente se llevó a cabo la detección de las sondas siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando un luminómetro FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech).

Para sacar el listado de dianas de los factores de transcripción analizados en el array, se utilizó el software Pathway Studio® (Ariadne Genomics, Inc, Rockville, MD, USA) (Nikitin y cols., 2003) seleccionando como algoritmo el que exista interacción directa y marcando como parámetros para filtrar el que tengan una regulación directa o indirecta. Para saber en qué vía de señalización participan un listado de proteínas determinado se utilizó la herramienta informática GeneCodis (Carmona-Saez y cols., 2007; Nogales-Cadenas y cols., 2009).

### **3.2.3.11. Medida del flujo glucolítico.**

La determinación del flujo glucolítico se realizó midiendo la velocidad inicial de formación de lactato mediante la determinación de la concentración de este metabolito presente en el medio de cultivo. El método se fundamenta en la conversión de L-lactato a piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de NAD<sup>+</sup> con la consiguiente formación de NADH, cuya concentración se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340nm. La adición de sulfato de hidracina permite el secuestro del piruvato formado, desplazando la reacción hacia la producción de piruvato. Se midió el flujo glucolítico en células tratadas o no tratadas, al 70% de confluencia en placas p6 con 2 ml de medio de cultivo fresco. A las 2h se tomaron alícuotas de 100 µl del medio. Las muestras recogidas se precipitaron con 4 volúmenes de ácido perclórico al 6% durante 45 min en hielo y, después de centrifugar 5 min a 11.000xg a 4°C, los sobrenadantes se neutralizaron en presencia de indicador universal y se usaron para la determinación enzimática del lactato (Cuezva y cols., 1982). Se mezclaron en la cubeta de reacción 200 µl de agua, 500 µl de la mezcla de reacción (Glicina 1M, Hidracina-SO<sub>4</sub> 0,4M, EDTA 1,3mM, NAD<sup>+</sup> 7,5mM, pH=9,5) y en último lugar 300 µl de muestra y se realizó una prelectura a 340nm en el

espectrofotómetro (E0). A continuación, se añadieron 10 µl de la enzima LDH (Roche) y se midió a la misma longitud de onda transcurridos 40 min (E1). Se calculó la concentración de lactato expresado como nmoles de lactato producido por µg de proteína y hora aplicando la ley de Lambert-Beer ( $E1-E0=C \cdot l \cdot \epsilon$ ).

#### **3.2.3.12. Medida del consumo de oxígeno en células adheridas a placa.**

La determinación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) se realizó con el analizador de flujo extracelular XF24 (Seahorse Bioscience, Billerica, MA). Las medidas se realizaron en placas de 24 pocillos estériles especiales que contienen los dos biosensores fluorescentes (O<sub>2</sub> y pH) así como cuatro puertos diferentes por pocillo útiles para permitir la inyección secuencial de diferentes compuestos. Los biosensores del aparato se calibraron antes de cada experimento con el fin de asegurar una ganancia única del sensor basada en la señal proporcionada por la medida de calibrado en una solución de referencia con valores de oxígeno y pH conocidos. Las células se sembraron a una densidad de 8-32.000 células por pocillo en un volumen de 100 µl de medio. 2h después se añadieron 150 µl de medio para asegurar la correcta distribución de las células en el pocillo. Se realizaron los tratamientos correspondientes incubando siempre la placa a 37°C y 7% CO<sub>2</sub>. El día del experimento el medio se sustituyó por 700 µl de medio de cultivo. Las células se dejaron en una estufa a 37°C durante al menos 1h para equilibrar la temperatura y el pH. Los datos de consumo de oxígeno se expresaron como femtomoles de oxígeno consumido por minuto y por célula.

#### **3.2.3.13. Citometría de flujo.**

Una suspensión en PBS de células tripsinizadas se centrifugaron 5 min a 1200 rpm a 4°C y el precipitado se resuspendió en solución de FACS (FBS 1%, NaN<sub>3</sub> 0,1 % y PBS 1X). La suspensión celular se analizó en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.) utilizando el programa CellQuest suministrado por el fabricante. En cada condición se analizaron al menos 10.000 células. Los resultados se analizaron con el programa FloJo para Mac.

#### **3.2.3.14. Análisis del ciclo y muerte celular por tinción con yoduro de propidio.**

Este método se basa en la tinción del DNA de células que han sido previamente fijadas con yoduro de propidio, compuesto fluorescente que se intercala entre las bases de DNA emitiendo fluorescencia, de tal modo que la intensidad de la misma es proporcional a la cantidad de DNA de la célula y se puede medir por citometría de flujo. Esta tinción tiene una doble aplicación: por una parte permite analizar el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, y por otra, el porcentaje de células apoptóticas (subG0), ya que, como consecuencia de la fragmentación del DNA aparece un pico de células hipodiploide (Darzynkiewicz y cols., 1992). Las células se lavaron con PBS y se despegaron de la placa mediante tripsinización. También se recogió el medio de cultivo con el fin de no perder

aquellas células que se habían despegado de la placa como consecuencia del proceso de apoptosis. De esta forma se obtuvo una suspensión de células que se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min y a 4°C. El sedimento celular se lavó con PBS y tras resuspender las células en PBS frío, se fijaron añadiendo la cantidad correspondiente de etanol absoluto (a -20°C) para dejarlo al 70%. La suspensión celular se mantuvo a -20°C al menos 12h. Para la tinción con yoduro de propidio se centrifugaron a 900xg a 4°C durante 5 min. El sedimento celular se lavó 2 veces en PBS frío y las células se resuspendieron en 300 µl de tampón de ciclo (PBS, RNAsa A 100 µg/ml y yoduro de propidio 50 µg/ml) a temperatura ambiente y se incubaron 30 min a 37°C. Tras la incubación, se mantuvieron a 4°C y protegidas de la luz hasta el momento de ser analizadas por citometría de flujo (3.2.3.13).

#### **3.2.3.15. Determinación de la producción de radicales libres de oxígeno.**

Posteriormente a los tratamientos celulares que se indican, para la medida de los ROS mitocondriales, se marcaron las células con la sonda MitoSOX (Molecular Probes, Eugene, Oregon) diluida en PBS completo a una concentración de 5 µM durante 10 min a 37°C protegidas de la luz. La sonda MitoSOX es un nuevo indicador fluorescente que permite la detección selectiva de radical superóxido en la mitocondria de células vivas. Esta sonda, una vez que entra dentro de la célula se dirige a la mitocondria de una forma rápida y selectiva. Una vez en la mitocondria, la sonda se oxida fácilmente por el superóxido pero no por otras especies reactivas de oxígeno (ROS) o especies reactivas de nitrógeno (RNS). El producto de oxidación se vuelve altamente fluorescente al unirse a ácidos nucleicos y puede ser detectado por citometría de flujo a una longitud de onda de 580 nm de emisión al ser excitado con una longitud de onda de 510 nm. Después de la incubación, se lavaron las células con PBS completo y se levantaron con tripsina. El sedimento celular, se resuspendió en tampón de FACS y se pasó por el citómetro. Para la medida de los ROS citoplasmáticos, las células se resuspendieron en 300 µl de PBS con la sonda di-acetoximetil éster del 6-carboxi-diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH2-DA) (Molecular Probes, Eugene, Oregon) a una concentración de 5 µM. Este análogo, después de la oxidación e hidrólisis por las esterasas intracelulares forma carboxi-diclorofluoresceína, que al tener cargas negativas adicionales impiden su difusión fuera de la célula. La oxidación posterior por el peróxido de hidrógeno da lugar al compuesto fluorescente, 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que puede ser detectado por citometría de flujo a una longitud de onda de 534 nm de emisión al ser excitado con una longitud de onda de 510 nm. Las muestras se incubaron con esta sonda durante 30 min a 37°C, se lavaron una vez con PBS y se analizaron por citometría de flujo (3.2.3.13).

#### **3.2.3.16. Análisis de la proliferación celular.**

Las células ( $4 \times 10^5$ ) sometidas a los distintos tratamientos se marcaron en el medio de cultivo con la sonda 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (Edu.) a una concentración de 10 µM durante 24h.



Edu es un nucleósido análogo de la timina que se incorpora al DNA durante su replicación. Pasadas 24h, la incorporación de EdU en el DNA celular se determinó usando el kit Click-iT EdU Flow Cytometry Assay (Molecular Probe). La detección se basa en la reacción química covalente catalizada por cobre entre una azida acoplada a Alexa Fluor 555 y un alquino que se encuentra en la fracción etinil de Edu. El análisis de los datos permite determinar el porcentaje de células en fase S en la población celular.

### **3.2.3.17. Determinación de la carbonilación de proteínas celulares.**

Para la determinación de la carbonilación de proteínas se utilizó el “Oxyblot Oxidized Protein Detection Kit” (Chemicon Internacional). El método se basa en la detección y cuantificación de proteínas modificadas por radicales libres de oxígeno. Estas modificaciones tienen como consecuencia la introducción de grupos carbonilo en las cadenas laterales de las proteínas que se derivan a DNP-hidrazona por la reacción con DNPH. Las muestras de proteína derivadas a DNP se separan en geles de poliacrilamida seguido del protocolo habitual de *Western blot* (3.2.2.10). Para ello, el sedimento celular de las células sometidas a distintos tratamientos se lavó con PBS y se extrajo la proteína como se describe en el apartado (3.2.2.1). A continuación, se llevó a cabo la derivatización de las proteínas celulares (20 µg) mediante la incubación con dinitrofenilalanina (DNPH) durante 30 min. Las muestras proteicas así derivadas se fraccionaron en geles al 12% y se procesaron mediante *Western blot*. Junto a las muestras derivadas se fraccionaron muestras control sin derivar. El anticuerpo primario utilizado fue anti-DNP a una dilución 1:500 y el secundario a una dilución 1:300 siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **3.2.3.18. Ensayo de la actividad promotora de NFκB.**

Las células se cotransfectaron con el plásmido pNF3ConA que posee el promotor de NFκB acoplado al gen reportero de luciferasa (plásmido de interés) y con el plásmido CDL-pβ-GFP-β-3'UTR (Martinez-Diez y cols., 2006) (plásmido control). La actividad luciferasa se determinó en placa usando el kit comercial “Luciferase Assay System” de Promega en el luminómetro FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech). La luz se produce mediante la conversión de la energía química de oxidación de la luciferina a través de una transición de electrones. Oxidación que cataliza la luciferasa de la luciérnaga, una proteína monomérica de 61kDa, utilizando ATP-Mg<sup>2+</sup> + como co-sustrato. Antes de cada medida se llevó a cabo una calibración para determinar el rango lineal de detección de luz. Como control se midió la fluorescencia emitida por la GFP cotransfectada en cada muestra.

### **3.2.3.19. Determinación de ATP/ADP/AMP.**

La concentración de ATP se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm por aparición de NADPH en la reacción enzimática acoplada con hexoquinasa y glucosa-6-P-deshidrogenasa en tampón Tris 50 mM pH 7.5, en presencia

de NADP<sup>+</sup>, glucosa y Cl<sub>2</sub>Mg<sub>2</sub>. La concentración de los nucleótidos ADP/AMP se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm por aparición de NADH en la reacción enzimática acoplada con lactato deshidrogenasa, piruvato quinasa y miosina quinasa en tampón Tris 0.45M pH 7.5/CO<sub>3</sub>K<sub>2</sub> 0.55M, en presencia de NAD<sup>+</sup>, fosfoenolpiruvato y una solución de SO<sub>4</sub>Mg/ClK.

Después de los correspondientes tratamientos, las células de lavaron con PBS y se recogieron mediante tripsinización. El sedimento celular se precipitó con 100 µl de ácido perclórico al 6%. Tras 1 h a 4°C los precipitados se centrifugaron y el sobrenadante resultante se neutralizó con KOH al 2% en presencia de 5 µl de indicador universal. El volumen resultado de la neutralización se volvió a centrifugar con objeto de sedimentar el KClO<sub>4</sub> y el sobrenadante se liofilizó. A la hora de determinar la concentración de ATP/ADP/AMP en las muestras, los liofilizados se resuspendieron en un volumen adecuado de agua milliQ para tener aproximadamente 2x10<sup>6</sup> células en 100 µl, y se procedió a la medida.

#### **3.2.3.20. Determinación de las razones NAD/NADH y GSH/GSSG.**

La razón NAD/NADH se determinó en placa usando el kit comercial “NAD<sup>+</sup>/NADH Quantification kit” (BioVision, Milpitas, CA, EE.UU) que se basa en reacciones enzimáticas para la detección de NAD y NADH. La concentración de NAD y de NADH se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm en el luminómetro FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de cada medida se llevó a cabo una calibración para determinar el rango lineal de detección de densidad óptica.

La razón GSH/GSSG se determinó en placa usando el kit comercial “Glutathione (GSH/GSSG/Total) Assay Kit” (BioVision, Milpitas, CA, EE.UU). La concentración de GSH y de GSSG se determinó midiendo la fluorescencia a una longitud de onda de 420 nm de emisión al ser excitado con una longitud de onda de 340 nm en el luminómetro FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) siguiendo las instrucciones del fabricante. La luz se produce mediante la reacción del o-ftalaldehido con el GSH. Antes de cada medida se llevó a cabo una calibración para determinar el rango lineal de detección de fluorescencia.

#### **3.2.3.21. Estadística aplicada.**

Se aplicó el estadístico de contraste de la t de Student que compara las medias de dos variables que siguen una distribución normal para determinar la significatividad estadística de los resultados. Para comparar las vidas medias de las proteínas en distintas condiciones, se analizó la correlación lineal entre las distintas pendientes, así como el intervalo de confianza de cada una de ellas usando el software SPSS.



# ***RESULTADOS***



#### **4. RESULTADOS**

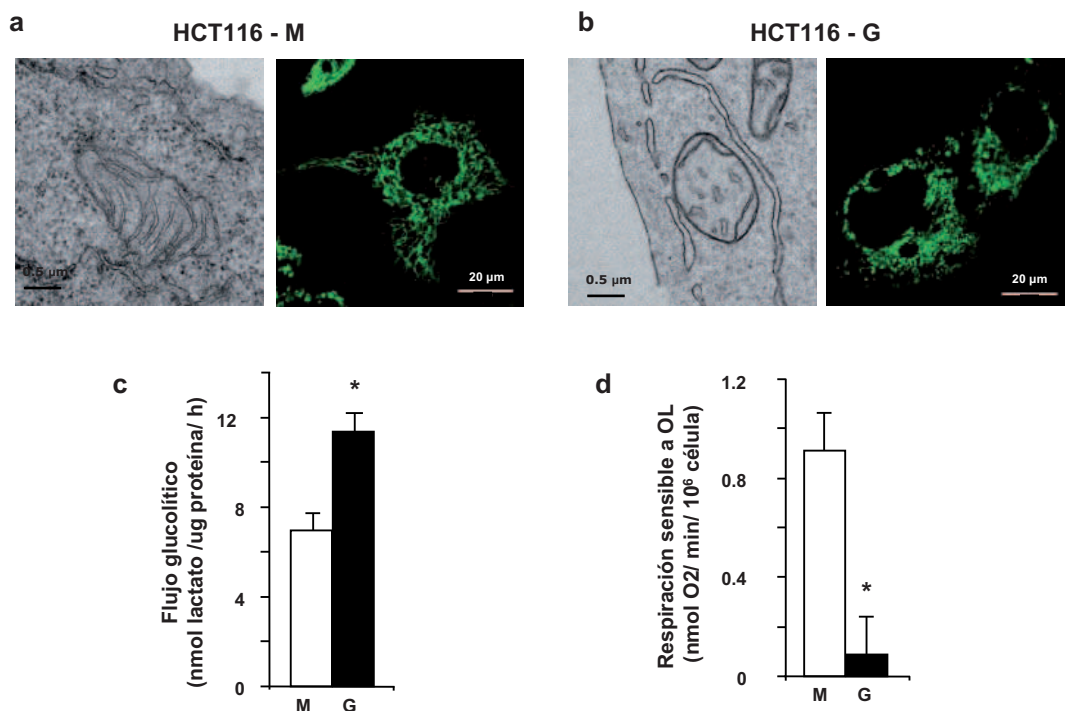
Hoy día es innegable que la reprogramación metabólica juega un papel clave en el desarrollo del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011). En este sentido, en los últimos años hemos definido la *huella bioenergética del cáncer* mediante una aproximación proteómica sencilla que consiste en analizar los niveles de expresión de un marcador de la fosforilación oxidativa ( $\beta$ -F1-ATPasa), un marcador estructural de la mitocondria (Hsp60) y una proteína del metabolismo glucolítico (GAPDH). Con estos trabajos hemos demostrado que la alteración del fenotipo bioenergético celular es un rasgo característico de la mayoría de los carcinomas (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2009; Willers y Cuezva, 2011). La huella bioenergética además constituye una herramienta para el pronóstico de pacientes con distintos tipos de carcinomas (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005; Aldea y cols., 2011) y para la predicción de la respuesta al tratamiento (Shin y cols., 2005; Cuezva y cols., 2009; Sanchez-Arago y Cuezva, 2011).

Con el objetivo de evaluar en profundidad la contribución de la mitocondria en la progresión tumoral, nuestro laboratorio generó recientemente líneas isogénicas de carcinoma colorrectal humano HCT116, que expresaban diferentes niveles de  $\beta$ -F1-ATPasa (Sanchez-Arago y cols., 2010). Con este fin, las células HCT116 se trataron con oligomicina (OL), un inhibidor específico de la  $H^+$ -ATP sintasa. El tratamiento con OL (células G) promueve una disminución de la expresión de  $\beta$ -F1-ATPasa, esto es, de la huella bioenergética y el cambio metabólico de las células a una glucólisis aerobia más intensa cuando se comparan con células sin tratar (células M) (Sanchez-Arago y cols., 2010). Los diferentes fenotipos celulares que se generaron mostraban grandes diferencias en cuanto a ultraestructura, transcriptoma, proteoma y funcionalidad de sus mitocondrias y lo que es más importante en la capacidad que éstas tenían para generar tumores *in vivo*. En efecto, cuando estas células se implantaron en ratones inmunodeprimidos, las células tratadas con OL generaron tumores mucho más rápido que las células sin tratar (Sanchez-Arago y cols., 2010). Más importante aún, cuando se hizo el análisis de los tumores derivados de los tipos celulares estudiados, todos resultaron ser iguales entre sí y tener el fenotipo mitocondrial, el transcriptoma y proteoma de las células altamente glucolíticas tratadas con OL. Estos resultados pusieron de manifiesto la existencia de un fenómeno de selección celular y la importancia del microambiente para la generación de tumores (Sanchez-Arago y cols., 2010). Por estos resultados consideramos que las células tratadas con OL constituían un modelo ideal para estudiar en profundidad los mecanismos y vías de señalización implicados en la adquisición del fenotipo tumoral agresivo.

## 4.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS DE CARCINOMA COLORRECTAL.

### 4.1.1. Caracterización estructural y metabólica.

En la figura 10 se puede observar la caracterización metabólica y mitocondrial de los fenotipos M y G de las células HCT116. El análisis detallado mediante técnicas de microscopía electrónica de secciones ultrafinas de cada uno de los tipos celulares puso de manifiesto que las células G contienen mitocondrias en su mayoría desprovistas de invaginaciones de la membrana interna o crestas mitocondriales (Fig. 10b), en comparación con los orgánulos presentes en células M con crestas más desarrolladas (Fig. 10a) (Sanchez-Arago y cols., 2010). La cuantificación de la longitud de las crestas en proporción al ancho de la mitocondria, significativamente menor en las células G, sirvió para confirmar estas diferencias (Sanchez-Arago y cols., 2010). Además, se llevó a cabo el análisis de ambos fenotipos por microscopía de fluorescencia utilizando células HCT116 que expresan de forma estable la proteína fluorescente GFP en la mitocondria. Los resultados muestran como las células tratadas con OL presentan mitocondrias de forma aberrante (puntiforme) (Fig. 10b) si se comparan con la forma filamentosa y alargada de las mitocondrias en las células con fenotipo M (Fig. 10a).



**Figura 10. Fenotipo estructural y bioenergético de células M y G.** Las células HCT116 se trataron con OL (barras negras, G) o se dejaron sin tratar (barras blancas, M). **a** y **b**. En los paneles de la izquierda, secciones ultrafinas de células M (a) y G (b) observadas al microscopio electrónico. En los paneles de la derecha, células HCT116 con fenotipo M y G que expresan de forma estable la proteína GFP en la mitocondria se observaron por microscopía de fluorescencia *in vivo*. Las imágenes revelan grandes diferencias ultraestructurales en las mitocondrias de células G frente a los orgánulos de células M. **c**. El histograma representa la tasa de glucólisis aerobia de las células M y G. **d**. La respiración sensible a oligomicina se determinó tras la adición de OL (6 μM). Las barras representan la media ±SEM de al menos tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a M.

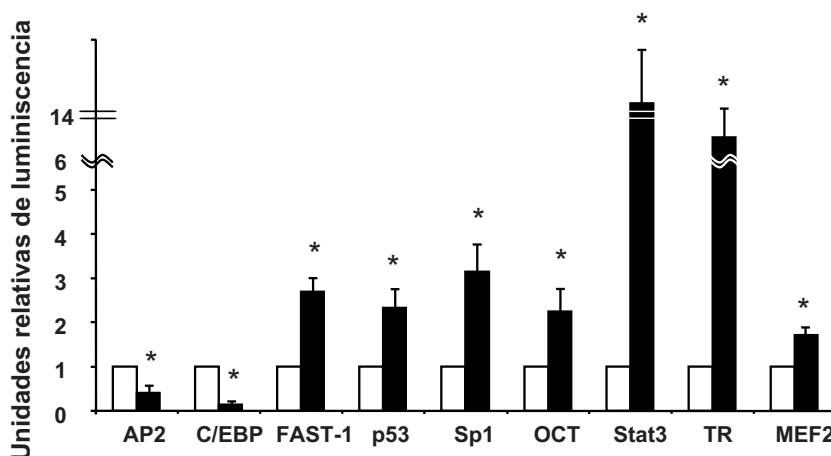
Con el fin de determinar si los cambios observados a nivel estructural se reflejaban en la actividad metabólica de las células HCT116, analizamos el flujo glucolítico de las mismas mediante la determinación de la producción de lactato. Los resultados indican que las células con fenotipo G tienen mayor flujo glucolítico aeróbico que las células M (Fig. 10c). Del mismo modo, se analizó el efecto que ejercía el tratamiento con OL sobre la respiración mitocondrial pudiendo observar como se produce una alteración muy evidente en la respiración sensible a OL (OSR) en las células G en comparación con las células M (Fig. 10d). En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con OL tiene un profundo impacto a nivel estructural y funcional de la mitocondria.

#### 4.1.2. Análisis de la activación de factores de transcripción.

A continuación se realizó un análisis de la actividad de los factores de transcripción que pudieran estar implicados en la reprogramación fenotípica de las células G. Los resultados obtenidos muestran la represión significativa en células G de factores de transcripción como AP2 (*transcription factor AP-2*) y CEBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) (Fig. 11). Por el contrario, podemos observar la activación significativa de factores de transcripción como FAST-1 (*forkhead box H1*), p53 (*tumor protein p53*), Sp1 (*Sp1 transcription factor*), OCT (*POU class homeobox*), STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*), TR (*Thyroid hormone receptor*) y MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) (Fig. 11). Estos factores de transcripción juegan un papel regulador en procesos tan importantes como son el desarrollo, la apoptosis, el control del ciclo celular y el metabolismo (Roberts y cols., 1991; Hilger-Eversheim y cols., 2000; Wang y cols., 2001; Yen, 2001; Potthoff y Olson, 2007). Utilizamos Pathway Studio® (Ariadne Genomics, Inc, Rockville, MD, USA) (Nikitin y cols., 2003), una herramienta muy útil para la interpretación de resultados experimentales en los contextos de las diferentes vías de señalización, de las redes de regulación de la expresión génica y de los mapas de interacción entre proteínas, para obtener la lista de proteínas diana de los factores de transcripción afectados. La principal ventaja del software es que te ofrece una lista totalmente actualizada con datos de nueva publicación mediante la tecnología MedScan® (Ariadne Genomics, Inc, Rockville, MD, USA) (Novichkova y cols., 2003). El software MedScan Reader 5.0 permite realizar búsquedas bibliográficas en PubMed y Google. Con la ayuda del servicio de Bioinformática del CBMSO pudimos comparar los listados de proteínas diana de cada factor de transcripción con la lista generada previamente en el análisis del transcriptoma de los fenotipos M y G que se había realizado con anterioridad en el laboratorio sobre la plataforma Affimetrix y que había permitido identificar la represión transcripcional de la mitocondria (Sanchez-Arago y cols., 2010). En este análisis, un total de 4.519 secuencias presentaron variaciones significativas en la comparación no emparejada entre M y G. Esta comparación, nos permitió saber qué porcentaje de las proteínas diana de los factores de transcripción estaba representado en nuestro sistema experimental con respecto al total de dianas de cada uno de los factores



según la literatura a 22 de Marzo de 2011 (Tabla 5). Salvo en el caso de FAST1, para todos los demás factores de transcripción se puede observar como algunas de sus dianas resultaron significativamente distintas en la comparativa del transcriptoma entre células M y G (Tabla 5). Estos resultados refuerzan el papel de estos factores en promover la reprogramación que tiene que poner en marcha la célula para adaptarse y adquirir el fenotipo agresivo G (Sanchez-Arago y cols., 2010).



**Figura 11. Actividad de factores de transcripción en células M y G.** Las células HCT116 se trataron con OL (barras negras, G) o se dejaron sin tratar (barras blancas, M). El histograma representa la actividad de los factores de transcripción que resultaron significativamente reprimidos (AP2 y C/EBP) o activados (FAST-1, p53, Sp1, OCT, Stat3, TR y MEF2) en las células G frente a células M. Las barras representan la media  $\pm$ SEM normalizada por el valor de la media en las células M en tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a M.

	Dianas Totales	Total de proteínas en el estudio transcriptómico	%
AP2	101	13	13
CEBP	366	32	9
FAST1	12	0	0
p53	532	52	10
SP1	920	76	8
OCT	95	4	4
STAT3	284	36	13
TR	50	6	12
MEF2	82	6	7

**Tabla 5. Estudio comparativo del número de genes diana de los factores de transcripción con los resultados del análisis transcriptómico entre células M y G.** En esta tabla se representa el número de genes diana de cada uno de los factores de transcripción que resultaron significativamente reprimidos o activados en el estudio de su actividad (ver Figura 11). En la tercera columna se muestra el número de genes del total de genes que muestran cambios significativos en el análisis transcriptómico entre células M y G (Sanchez-Arago *et al*, 2010) y en la cuarta columna el porcentaje del total que supone para los genes de esa vía.

Dado que muchas de las proteínas diana están reguladas por más de uno de los factores de transcripción, nos quedamos tan sólo con aquellas proteínas que no fueran redundantes (Anexo I). Además, seleccionamos aquellos genes cuyo valor de cambio era

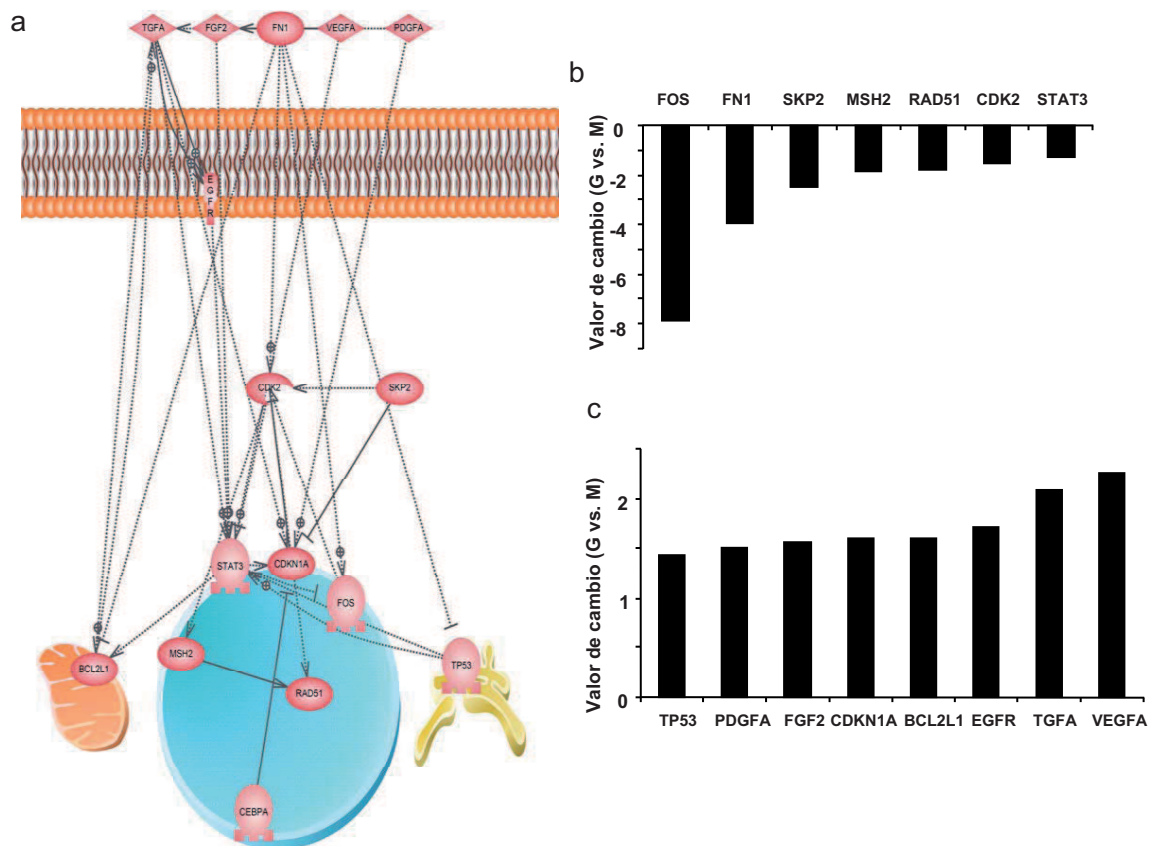
igual o superior a 1.5. Con estos criterios obtuvimos una lista de 62 genes (Anexo I). Con ayuda de la herramienta GeneCodis (Carmona-Saez y cols., 2007; Nogales-Cadenas y cols., 2009) pudimos saber a qué Rutas Kegg (diagramas que representan el conocimiento actual de redes e interacciones moleculares) estaban adscritas estas proteínas para así tener una idea de qué vías de señalización podrían estar implicadas (Tabla 6). Como podemos ver en la tabla, 16 de los 62 genes analizados (26%) estaban relacionados con vías de señalización en cáncer, lo cual da una importante validez a nuestro sistema experimental. Las interacciones que presentan todos estos genes y que coinciden con la regulación observada en el estudio del transcriptoma, están representados en el diagrama de la Figura 12 que se ha obtenido utilizando la herramienta Pathway Studio® (Ariadne Genomics, Inc, Rockville, MD, USA) (Nikitin y cols., 2003). En las figuras 12b y 12c se representa el valor de cambio de los genes en el estudio del transcriptoma (Sanchez-Arago y cols., 2010).

Vías de señalización	NG	Hyp	Hyp*
<b>Vías de señalización en cáncer</b>	<b>16 (62)</b>	<b>3E-13</b>	<b>3E-11</b>
Vía de señalización de MAPK	12 (62)	2E-08	1E-06
Vía de señalización de p53	7 (62)	9E-06	3E-04
Cáncer de páncreas	7 (62)	1E-05	3E-04
Ciclo celular	7 (62)	6E-04	1E-02
Cáncer de próstata	6 (62)	3E-03	5E-02
Adhesión	6 (62)	3E-01	3E+00
Glioma	5 (62)	2E-02	3E-01
Melanoma	5 (62)	3E-02	4E-01
Cáncer de pulmón	5 (62)	8E-02	1E+00
Apoptosis	5 (62)	9E-02	1E+00
Sarampión	5 (62)	8E-01	6E-01
Hepatitis C	5 (62)	8E-01	6E+00
Vía de señalización de VEGF	4 (62)	2E+00	1E-04
Cáncer de vejiga	4 (62)	2E-01	2E+00

**Tabla 6. Vías de señalización implicadas en la adquisición del fenotipo G.** La tabla resume las vías de señalización que se identificaron con la herramienta GeneCodis incluyendo los factores de transcripción (Fig. 11) y aquellos de sus genes diana que tuvieran un valor de cambio de al menos 1.5 en el estudio transcriptómico (Sanchez-Arago *et al.*, 2010). NG: número de genes de cada una de las vías de señalización, entre paréntesis se muestra el número total de genes en el estudio. Hyp: p valor hipergeométrico. Hyp\*: p valor hipergeométrico corregido.

En el diagrama podemos observar numerosos factores de crecimiento como TGFA (*Transforming growth factor alpha*), PDGFA (*Platelet-derived growth factor subunit A*), VEGFA (*Vascular endothelial growth factor A*) y FGF2 (*Basic fibroblast growth factor*) y la proteína FN1 (*Fibronectin*) (Fig. 12a). Todos ellos están directamente relacionados con el cáncer ya que participan en procesos de adhesión, crecimiento, migración y diferenciación celular. Como se puede ver en el diagrama, estos factores mandan señales que activan o inhiben la actividad de proteínas clave directamente o vía EGFR (*Epidermal growth factor*

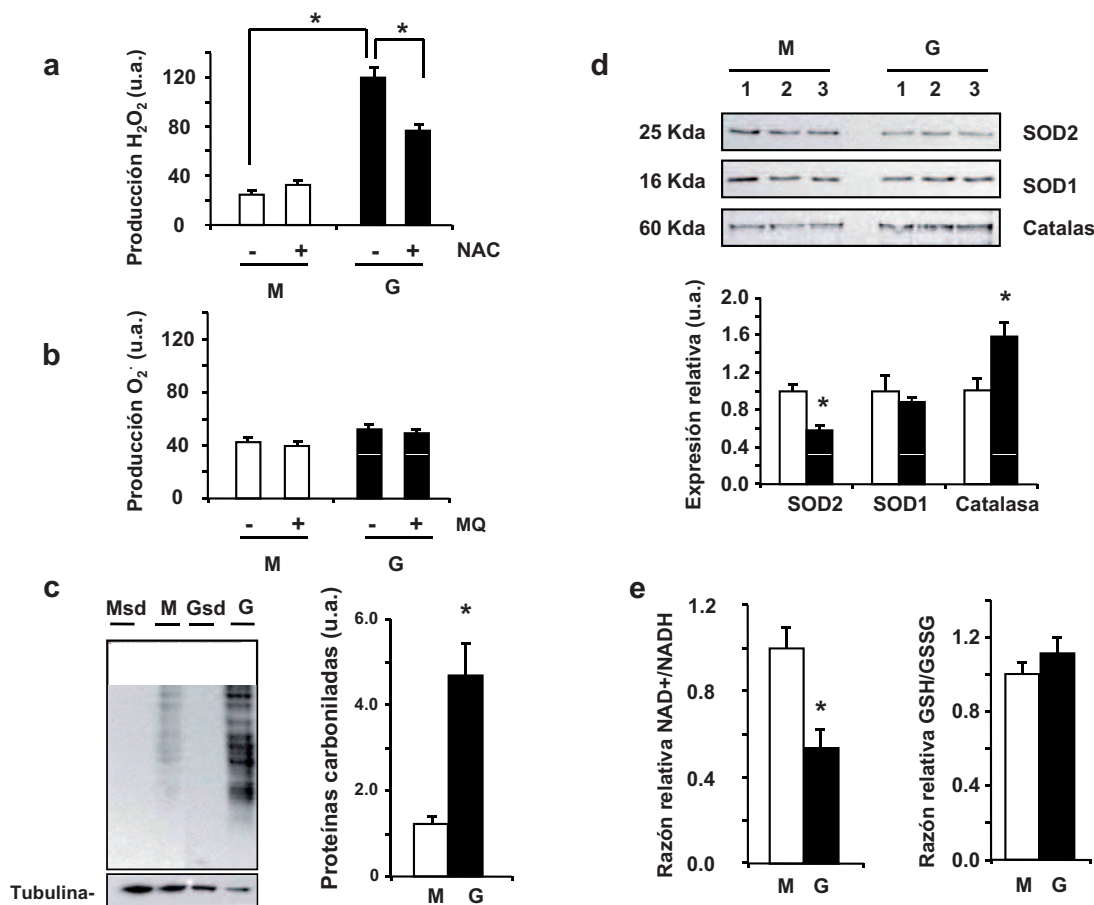
receptor) (Fig. 12a). Las proteínas diana son quinasas responsables del control del ciclo celular, CDKN1A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*), CDK2 (*Cyclin-dependent kinase 2*) o SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 2*), la proteína anti-apoptótica Bcl-x1, MSH2 (*mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1*) que es un gen asociado con el cáncer de colon hereditario, RAD51 (*RAD51 homolog*) que es un gen implicado en la reparación del daño al DNA y los factores de transcripción FOS (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*), STAT3, CEBPA (*CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha*) y p53 (Fig. 12a). De los 62 genes analizados, muchos otros estaban implicados en vías tan importantes como la vía de p53, MAPK, control del ciclo celular y la vía de señalización de VEGF (Tabla 6), todas ellas también muy relacionadas con el cáncer. En su conjunto, estos resultados confirman la relevancia de los factores de transcripción aludidos en la adquisición de un fenotipo agresivo en células de carcinoma de colon.



**Figura 12. Las vías de señalización relacionadas con el cáncer están significativamente afectadas en las células G.** **a.** Representación de las relaciones existentes entre los 16 genes que están descritos en las vías de señalización de cáncer según la herramienta GenCodis. El diagrama se ha obtenido con la herramienta Pathway Studio. **b y c.** Los histogramas representan el valor de cambio de los genes FOS, FN1, SKP2, MSH2, RAP51, CDK2, STAT3, TP53, PDGFA, FGF2, CDKN1A, BCL2L1, EGFR, TGFA y VEGFA en el análisis transcriptómico realizado mediante la plataforma Affimetrix (Sanchez-Arago *et al*, 2010).

#### 4.1.3. Las células con fenotipo G tienen estrés oxidativo.

Las células HCT116 tratadas con OL presentan un incremento significativo en los niveles basales de peróxido de hidrógeno (Fig. 13a) que son parcialmente apantallados por el antioxidante NAC (Fig. 13a). Por contra, la detección del radical superóxido demostró la ausencia de diferencias significativas entre los fenotipos M y G (Fig. 13b). Consecuentemente, el agente antioxidante mitocondrial MQ no produjo variación significativa en los niveles de radical superóxido (Fig. 13b). De acuerdo con un mayor nivel basal de ROS en células con fenotipo G se observó un aumento muy significativo de la carbonilación de proteínas celulares (Fig. 13c).



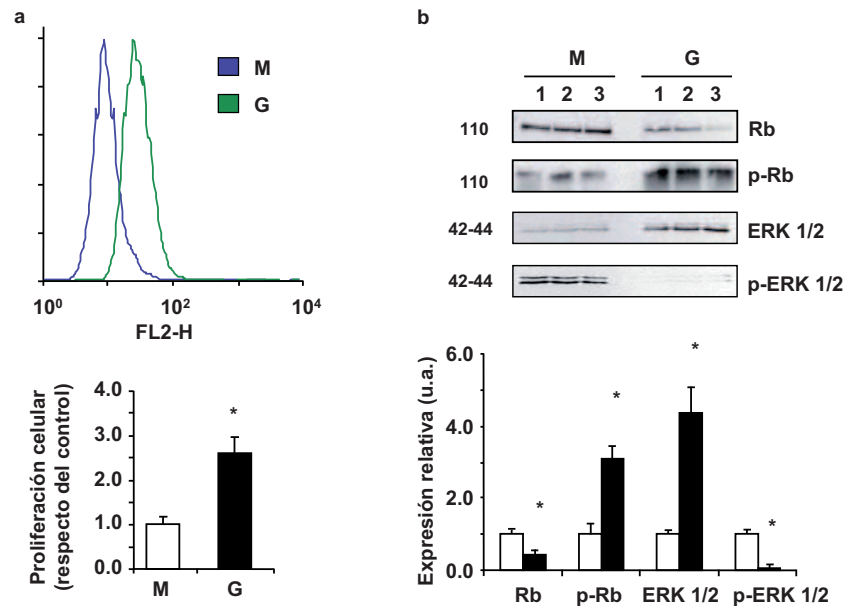
**Figura 13. Las células G tienen más estrés oxidativo que las células M.** Las células HCT116 se trataron con OL (barras negras, G) o se dejaron sin tratar (barras blancas, M). **a y b.** Determinación de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**a**) y del radical superóxido en la mitocondria (**b**) por citometría de flujo. La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y del radical superóxido en la mitocondria se determinó también en presencia y ausencia del antioxidante NAC (500  $\mu$ M) y del antioxidante mitocondrial mitoQ (20 nM) respectivamente. **c.** Extractos de proteína (20  $\mu$ g) se derivatizaron en presencia de DPNH y se procesaron para la identificación de grupos carbonilos de proteínas. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga y se procesaron muestras sin derivar como control (Msd y Gsd). **d.** Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas SOD2, SOD1 y catalasa en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3) de células M y G. Los histogramas muestran la cuantificación de las bandas normalizadas por el valor de la media en las células M. **e.** Análisis de las razones NAD<sup>+</sup>/NADH y GSH/GSSG. Los resultados representan la media  $\pm$ SEM normalizados por el valor de la media en las células M de al menos tres determinaciones independientes. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a M.

El estudio de las proteínas relacionadas con el sistema antioxidante celular reveló una caída significativa de la expresión de la enzima mitocondrial SOD2 (*superóxido dismutasa 2*), la ausencia de cambios en la enzima citoplasmática SOD1 (*superóxido dismutasa 1*) y un aumento significativo en la expresión de la enzima catalasa (Fig. 13d). El estado redox celular se analizó mediante la determinación de la razón NAD/NADH observando que es significativamente menor en células G que en células M (Fig. 13e). Este resultado está de acuerdo con que las células G tienen un metabolismo más glucolítico. Sin embargo, la razón GSH/GSSG, que es un marcador del estado redox celular, no reveló cambios significativos entre las células M y G (Fig. 13e). En general, estos resultados indican que las células G tienen un cierto grado de estrés oxidativo propiciado por la actividad citoplasmática de la célula y a que la sobre-expresión de catalasa que se observa en estas células no es capaz de revertir el daño oxidativo asociado a los radicales libres.

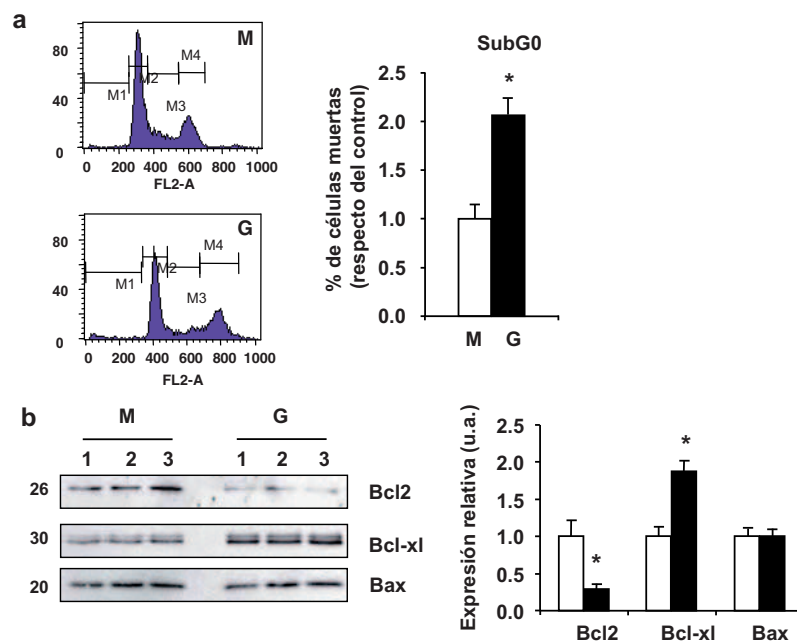
#### 4.1.4. Estudio de la proliferación y muerte celular en células con fenotipo G.

El estudio de la proliferación celular mediante la incorporación de EdU en DNA reveló que las células G tienen una mayor tasa de proliferación en comparación con las células M (Fig. 14a). Además, se observó una clara disminución de la forma total de Rb y aumento de su forma fosforilada en las células G en comparación con las células M. El aumento en la fosforilación de Rb indica una menor actividad de la proteína y por tanto un aumento en la capacidad proliferativa de las células G (Fig. 14b). También se observó un aumento en la forma total de la quinasa ERK 1/2 y disminución de su forma fosforilada en las células G en comparación con las células M. Estos datos sugieren la inhibición de la vía de señalización ERK 1/2 en las células con el fenotipo G (Fig. 14b) y concuerdan con resultados que describen que una inhibición de ERK previene la inducción de muerte celular por apoptosis (Wang y cols., 2000; Tang y cols., 2002).

El análisis del ciclo y muerte celular de ambos tipos celulares mostró un pico mayor en la fase subG0 en células G frente a células M lo que indica una mayor muerte celular en las células G (Fig. 15a). El estudio de la expresión de proteínas implicadas en apoptosis muestra la caída en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl2 en las células G al comparar con células M (Fig. 15b). Sin embargo, la proteína anti-apoptótica Bcl-xl está más expresada en células G que en células M (Fig. 15b). Por último, no se observaron cambios en la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax en células M y G (Fig. 15b). En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la relevancia del fenotipo bioenergético celular en el control de las rutas que promueven supervivencia y muerte celular.



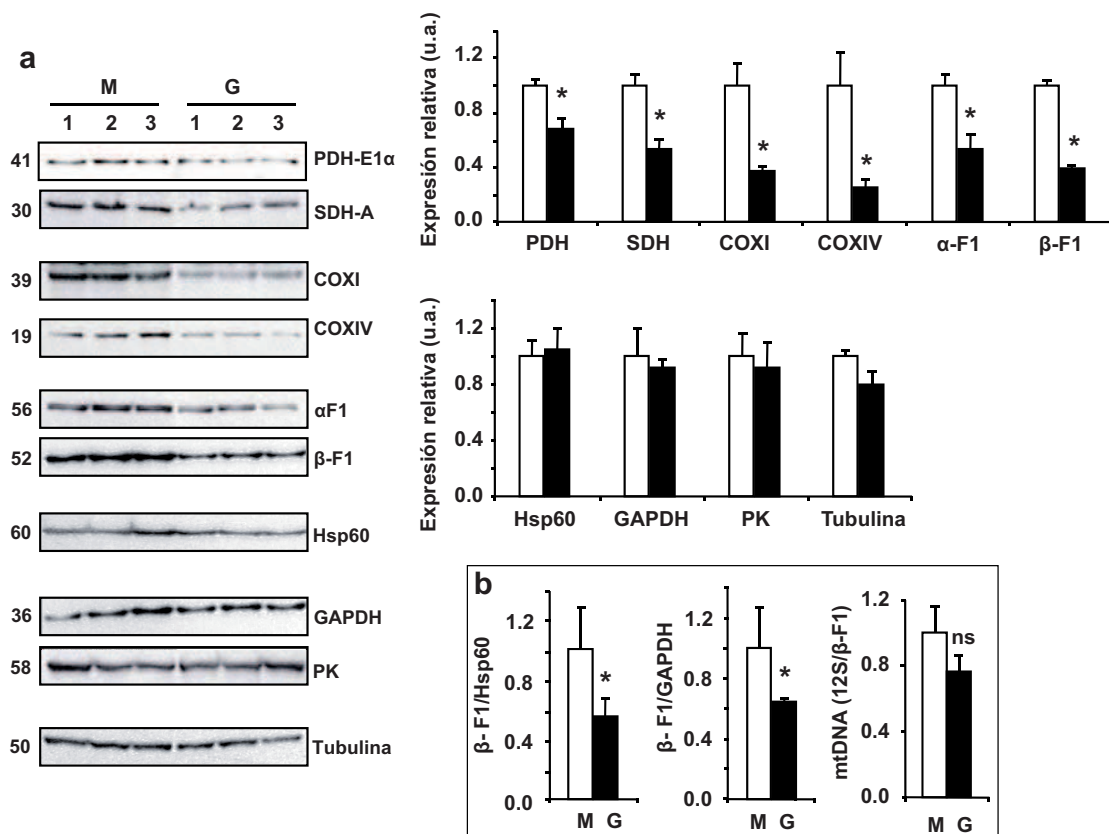
**Figura 14. Las células G presentan un fenotipo más proliferativo.** Las células HCT116 se trataron con OL (barras negras, G) o se dejaron sin tratar (barras blancas, M). **a.** La proliferación celular se determinó por la incorporación de EdU en el DNA que se analizó por citometría de flujo. En la figura se muestra un panel representativo de experimentos en células M (azul) y G (verde). El histograma representa la media geométrica de fluorescencia emitida normalizada por el valor de la media en células M. Las barras representan la media  $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a M. **b.** Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas Rb, p-Rb, ERK 1/2 y p-ERK1/2 en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3) de células M y G. Los histogramas muestran la media  $\pm$ SEM normalizada por el valor de la media en las células M de al menos tres determinaciones independientes. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a M.



**Figura 15. Estudio del ciclo celular en los fenotipos M y G.** Las células HCT116 se trataron con OL (barras negras, G) o se dejaron sin tratar (barras blancas, M). **a.** Para el estudio del ciclo celular, células M y G se tiñeron con yoduro de propidio y se analizó la población de células teñidas por citometría de flujo. En la figura se muestran dos paneles representativos de cada fenotipo. El histograma representa el porcentaje de células en la fase subG0 normalizado por el valor de la media en células M. **b.** Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas Bcl2, Bcl-xl y Bax en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3) de células M y G. Los histogramas muestran la media  $\pm$ SEM normalizada por el valor de la media en las células M de al menos tres determinaciones independientes. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a M.

4.1.5. El tratamiento con oligomicina reprime la diferenciación mitocondrial.

Análisis comparativos del transcriptoma de células HCT116 tratadas (G) y no tratadas (M) con oligomicina sugerían una represión global de la función metabólica y bioenergética de la mitocondria en las células G (Sanchez-Arago y cols., 2010). Por tanto, antes de estudiar los mecanismos y vías de señalización implicados en la adquisición del fenotipo G, quisimos comprobar si la represión mitocondrial en las células G se cumplía también a nivel del proteoma. Los resultados en la Figura 16a indican que las células G tienen una disminución significativa de la expresión de enzimas metabólicas como son PDH-E1 $\alpha$  (*piruvato deshidrogenasa*) y SDH-A (*succinato deshidrogenasa*), de las subunidades I (codificada en el DNA mitocondrial) y IV (codificada en el DNA nuclear) de la citocromo c oxidasa de la cadena respiratoria y de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la H<sup>+</sup>-ATP sintasa cuando se comparan con las células no tratadas (células M). Estos cambios ocurren en ausencia de cambios relevantes en los niveles de expresión de la proteína mitocondrial estructural Hsp60 (*heat shock 60kDa protein*) o en la abundancia de los marcadores glucolíticos GAPDH (*glicerolaldehido-3-fosfatodeshidrogenasa*) y PK (*piruvato quinasa*) (Fig. 16a).



**Figura 16. El tratamiento con oligomicina reprime la expresión de proteínas de la función bioenergética de la mitocondria.** Las células HCT116 se trataron con OL (barras negras, G) o se dejaron sin tratar (barras blancas, M). **a.** Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas PHD-E1 $\alpha$ , SDH-A, COXI, COXIV,  $\alpha$ F1,  $\beta$ -F1, Hsp60, GAPDH, PK y tubulina en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3) de células M y G. Los histogramas muestran la cuantificación de las bandas normalizadas por el valor de la media en las células M. **b.** Los histogramas representan los índices bioenergéticos  $\beta$ -F1/GAPDH y  $\beta$ -F1/Hsp60, así como la cuantificación por RT-qPCR de la cantidad de DNA mitocondrial (razón 12S/ $\beta$ -F1) en las células M y G. Los resultados son la media  $\pm$ SEM de al menos tres determinaciones independientes. ns, no significativo. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a M.

De esta manera, se observa como tanto el potencial bioenergético del orgánulo (razón  $\beta$ -F1/Hsp60) como el potencial mitocondrial global de las células tratadas con OL disminuye significativamente cuando se compara con células M (Fig. 16b). Es decir, que a nivel del proteoma es también evidente la represión de la expresión de las proteínas implicadas en la actividad de la mitocondria. Cabe destacar que estos cambios ocurren además en ausencia de cambios relevantes en el número de copias del DNA mitocondrial (Fig. 16b). Estos resultados indican que la mitocondria de células G tienen reprimida su diferenciación funcional (Valcarce y cols., 1988) y en definitiva que es necesaria la selección de células cancerosas con una función mitocondrial reprimida para la generación efectiva de tumores (Sanchez-Arago y cols., 2010).

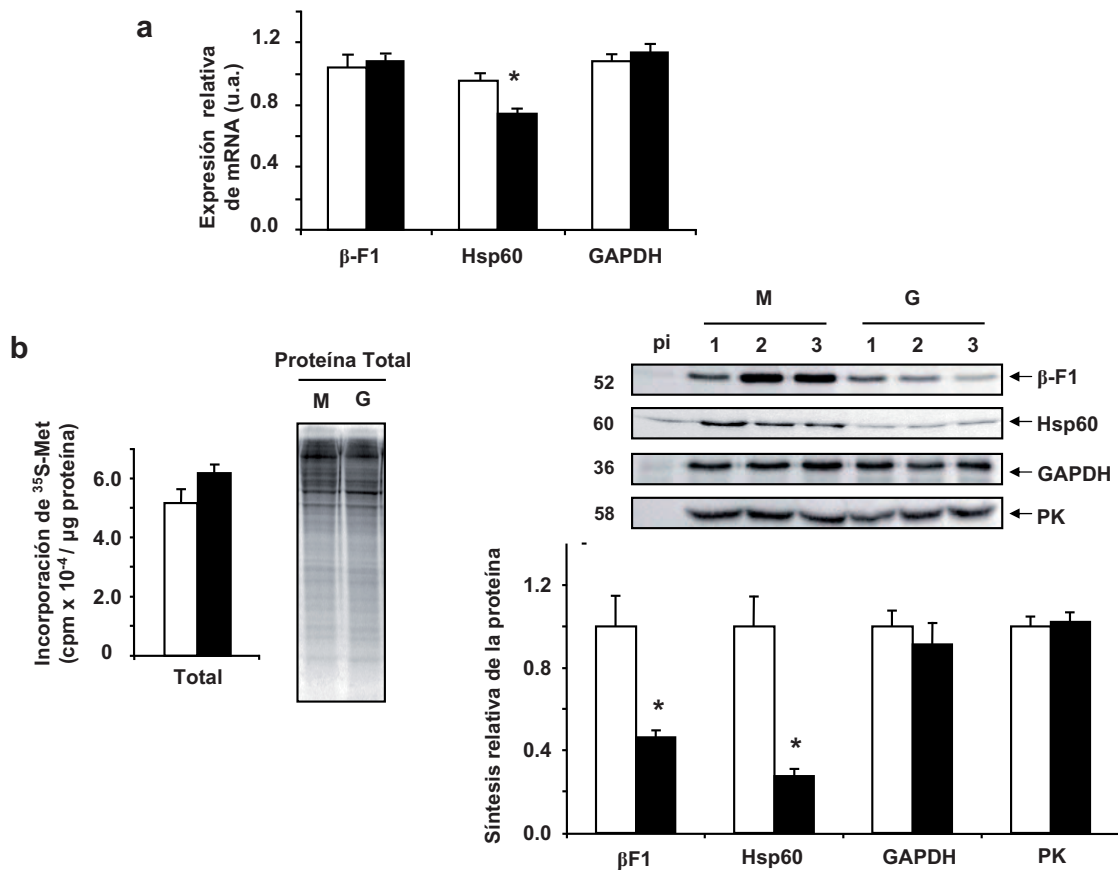
## **4.2. MECANISMOS Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADOS EN LA ADQUISICIÓN DEL FENOTIPO CELULAR AGRESIVO.**

### 4.2.1. Represión traduccional de la diferenciación bioenergética de la mitocondria en carcinoma colorrectal.

Lo siguiente que nos preguntamos fue qué mecanismo estaba mediando la represión de la expresión de las proteínas mitocondriales en el fenotipo G. La cuantificación por RT-qPCR del contenido celular de los mRNA que codifican  $\beta$ -F1-ATPasa y GAPDH mostró la ausencia de cambios significativos entre células M y G (Fig. 17a). Sí se observó una reducción del 15% en los niveles del mRNA de Hsp60 en las células G (Fig. 17a) aunque estas diferencias no tienen ningún efecto en la expresión de la proteína en estado estacionario (Fig. 16a). Estos datos indican que la regulación de la expresión de  $\beta$ -F1-ATPasa en las células tratadas con OL no se puede atribuir a una actividad limitada en la transcripción del gen ATP5B o mecanismos reguladores que afecten a la abundancia de su mRNA. Por el contrario, los resultados sugieren que la expresión de  $\beta$ -F1-ATPasa está siendo controlada a nivel de la traducción.

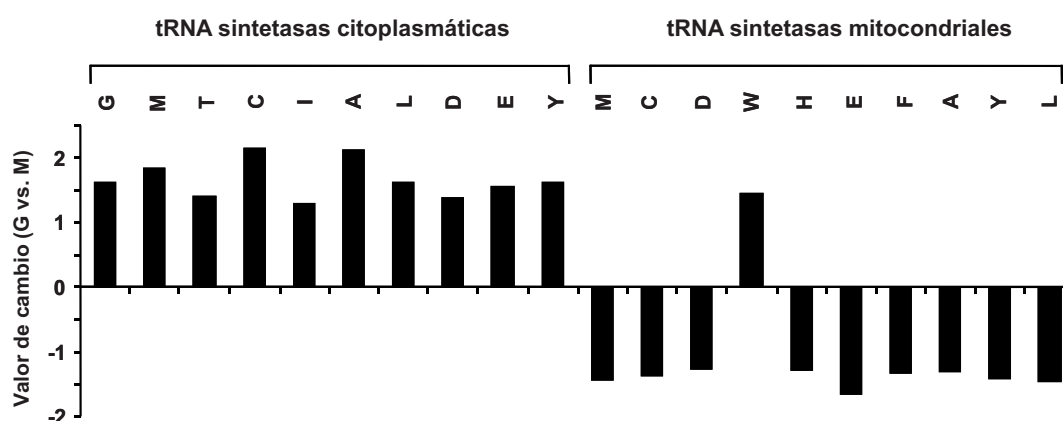
Para confirmar esto, se estudiaron las velocidades iniciales de síntesis de proteínas después de un pulso corto con  $^{35}\text{S}$ -metionina en ausencia y presencia de OL. No se observaron diferencias significativas en la velocidad total de síntesis de proteínas al comparar las células M y G (Fig. 17b). Los resultados sí mostraron una reducción significativa de 2-3 veces en la velocidad inicial de síntesis de las dos proteínas mitocondriales  $\beta$ -F1-ATPasa y Hsp60 en las células G cuando se compara con la de células M (Fig. 17b). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en las velocidades iniciales de síntesis de las dos proteínas glucolíticas GAPDH y PK entre células M y G (Fig. 17b). Estos resultados apoyan que el cambio del fenotipo no agresivo (M) al fenotipo agresivo (G) de las células de carcinoma de colon implica la represión específica de la traducción de mRNAs que codifican proteínas mitocondriales.





**Figura 17. La función bioenergética de la mitocondria se regula por control traduccional.** Las células HCT116 se trataron con OL (barras negras, G) o se dejaron sin tratar (barras blancas, M). **a.** Se extrajo el RNA total de las células y se analizó por RT-qPCR la cantidad relativa de los mRNAs de  $\beta$ -F1, Hsp60 y GAPDH. Las barras representan la media  $\pm$ SEM de tres experimentos distintos. **b.** Se determinó la velocidad inicial de síntesis *in vivo* de las proteínas  $\beta$ -F1, Hsp60, GAPDH y PK en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3) de células M y G. Para ello, se realizó un marcaje metabólico de 40 minutos con  $^{35}\text{S}$ -metionina de las células. A continuación se inmunoprecipitaron las proteínas y se visualizó la proteína sintetizada tras el fraccionamiento de los inmunoprecipitados en geles de poliacrilamida-SDS (9%). Se determinó la incorporación de radiactividad total a proteína mediante precipitación con TCA. Los histogramas representan la media  $\pm$ SEM de 3-6 determinaciones independientes normalizada por el valor de la media en las células control pi: inmunoprecipitados con IgGs de ratón no específicas. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a M.

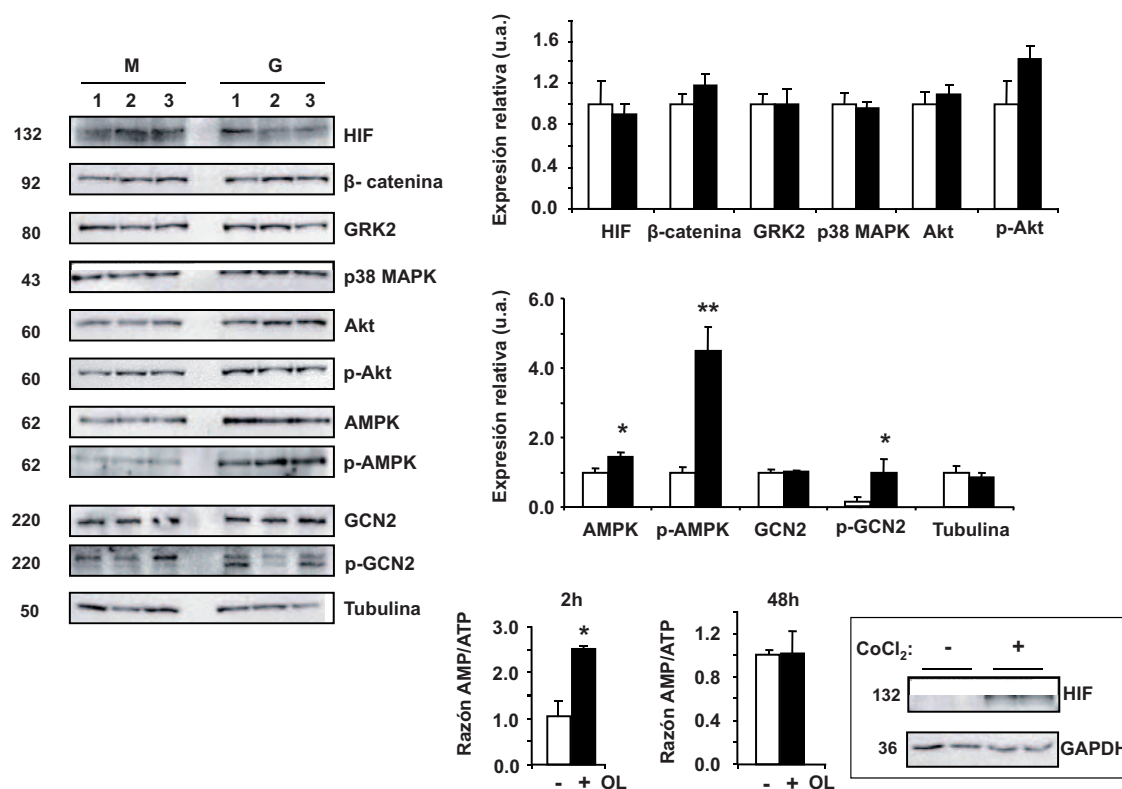
El estudio transcriptómico entre células M y G (Sanchez-Arago y cols., 2010), además indicó una represión muy significativa ( $P$  valor de benjamini=5.4E-5) en la expresión de un gran número de aminoacil-tRNA sintetasas mitocondriales en las células G (Fig. 18). Este hecho implica la posible existencia de una regulación por control traduccional para la expresión coordinada de ambos genomas tal y como se descubrió en desarrollo (Ostronoff y cols., 1996). La ausencia de cambios en la expresión de Hsp60 en células G (Fig.16a), a pesar de presentar una menor velocidad de síntesis en estas células (Fig. 17b), sugiere la participación de mecanismos adicionales que regulan la cantidad de esta proteína en la células y que posiblemente impliquen el recambio de la misma.



**Figura 18. Las tRNA sintetasas mitocondriales están inhibidas en las células G.** El estudio transcriptómico de las células G frente a las células M mediante la plataforma Affymetrix reveló que las aminoacil-tRNA sintetasas mitocondriales están mayoritariamente inhibidas en las células G mientras que las aminoacil-tRNA sintetasas citoplasmáticas son más abundantes en las células G al comparar con las células M. P valor =5.4 E-5 según el test de Benjamini.

#### 4.2.2. Regulación de la represión de la diferenciación mitocondrial

Se estudiaron algunas de las principales vías de señalización implicadas en el control de la proliferación celular, la supervivencia y la invasión que podrían participar en la represión de la función bioenergética de la mitocondria en esta situación. Se encontró que HIF1 $\alpha$  (*Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit*) no se expresa de manera diferencial en las células con el fenotipo M y G (Fig. 19), resultado que es consistente con la observación de que la OL bloquea la expresión de HIF1 $\alpha$  (Gong y Agani, 2005). Resultados similares se obtuvieron con  $\beta$ -catenina, GRK2 (*G-protein-coupled receptor kinase 2*), p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinases*) y tanto para la forma total como la forma fosforilada de la serina/treonina quinasa Akt (*v-Akt murine thymoma viral oncogene*) (Fig. 19). Se encontraron diferencias significativas en la expresión de las quininas de estrés AMPK (*AMP-activated protein kinase*) y GCN2 (*general control nonrepressed 2*), especialmente, en sus formas fosforiladas (Fig. 19), en células G frente a M, lo que sugiere la activación de estas vías de señalización para la adquisición del fenotipo G (Fig. 19). Consistente con la activación de AMPK se observó un incremento celular de la razón AMP/ATP después de 2h de tratamiento con OL (Fig. 19). Sin embargo, la razón AMP/ATP no es significativamente distinta 48h después del tratamiento con OL (Fig. 19).

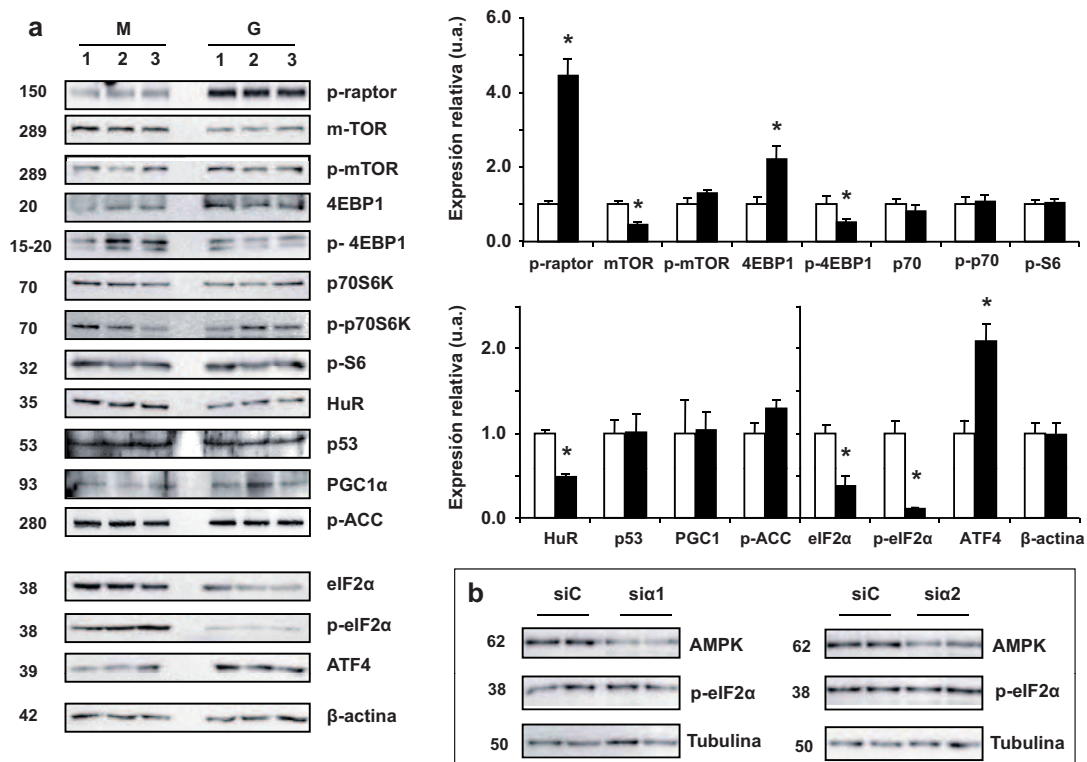


**Figura 19. La adaptación de las células al estrés metabólico requiere la activación de AMPK y GCN2.** Las células HCT116 se trataron con OL (barras negras, G) o se dejaron sin tratar (barras blancas, M). Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas HIF1 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin, GRK2, p38 MAPK, Akt, p-Akt, AMPK, p-AMPK, GCN2, p-GCN2 y tubulina en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3) de células M y G. Los histogramas muestran la cuantificación de las bandas normalizadas por el valor de la media en las células M. La razón AMP/ATP se determinó en las células M después de 2h y 48h de tratamiento con 6  $\mu$ M de OL y se normalizó por la media del valor en las células sin tratar. Las barras representan la media  $\pm$ SEM de nueve determinaciones distintas. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a M. En la figura se muestra un *western blot* representativo que demuestra que el anticuerpo usado contra HIF1 $\alpha$  reconoce la proteína en células tratadas con el inductor de hipoxia, cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>), durante 6h.

#### 4.2.3. Las vías de señalización AMPK y GCN2 reprimen la diferenciación mitocondrial.

AMPK es la proteína quinasa encargada de regular el metabolismo energético (Hardie y cols., 2003) y controla la actividad de mediadores esenciales en la respuesta de adaptación celular como son el factor de transcripción p53 (*tumor protein p53*), HuR (*ELAV-like protein*) que es un regulador post-transcripcional de la expresión génica y mTOR (*mammalian target of rapamycin*). De acuerdo con una activación de AMPK en las células G se observó una fuerte fosforilación de raptor y una disminución en la expresión de las proteínas mTOR y HuR, en ausencia de cambios relevantes en p53 cuando se compara con el fenotipo M (Fig. 20a). Está ampliamente descrito que la activación de AMPK promueve la inhibición por fosforilación de la acetil-CoA-carboxilasa, cuello de botella en la vía de síntesis de lípidos. Observamos que en el caso de las células G no se ve afectada la fosforilación de la acetil-CoA-carboxilasa (Fig. 20a), lo que sugiere la relevancia de esta vía en células tumorales para permitir la proliferación celular.

La serina/treonina quinasa mTOR controla la traducción y la autofagia (Sarbasov y cols., 2005). De acuerdo con una señalización menor de mTOR en las células G respecto de M mediado por la fosforilación de raptor (Fig. 20a) se observó un aumento en el contenido celular del represor de la traducción cap-dependiente 4EBP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein*) (Fig. 20a) (Brunn y cols., 1997). Por el contrario, la forma fosforilada de 4EBP1 disminuye en el células G lo cual sugiere el secuestro del factor de iniciación de la traducción 4E en estas células (Silvera y cols., 2010). Por otra parte y sorprendentemente, hemos observado como otras dianas de mTOR como p70S6K (*ribosomal protein S6 kinase 70 kDa polypeptide 1*) y su forma fosforilada (p-p70S6K), la forma fosforilada de la proteína ribosomal S6 y el co-activador de la transcripción PGC1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1  $\alpha$* ) que controla la biogénesis de las mitocondrias, no revelan cambios significativos en su expresión entre ambos fenotipos celulares (Fig. 20a).



**Figura 20. El estrés metabólico promueve cambios significativos en las proteínas diana de AMPK y GCN2.** Las células HCT116 se trataron con OL (barras negras, G) o se dejaron sin tratar (barras blancas, M). **a.** Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas p-raptor, m-TOR, p-mTOR, 4EBP1, p-4EBP1, p70S6K, p-p70S6K, p-S6, HuR, p53, PGC1 $\alpha$ , p-ACC, eIF2 $\alpha$ , p-eIF2 $\alpha$ , ATF4 y  $\beta$ -actina en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3) de células M y G. Los histogramas muestran la cuantificación de las bandas normalizadas por el valor de la media en las células M. Los resultados representan la media  $\pm$ SEM de tres a nueve determinaciones distintas. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a M. **b.** Análisis por *western-blot* de la expresión de AMPK, p-eIF2 $\alpha$  y tubulina después del silenciamiento de AMPK $\alpha$ 1 (si  $\alpha$ 1) y AMPK $\alpha$ 2 (si  $\alpha$ 2). Se utilizó un siRNA control (siC).

En consonancia con la activación vía fosforilación de la quinasa GCN2 en células G respecto de M (Fig. 19), se observó un incremento significativo del contenido celular del factor de transcripción ATF4 (*Activating transcription factor 4*) (Fig. 20a). Está descrito que GCN2 reprime la traducción vía fosforilación de eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic translation initiation factor 2  $\alpha$* ). Sin embargo, en nuestro estudio el contenido de la forma total y la forma fosforilada de eIF2 $\alpha$  es menor en las células G que en las M (Fig. 20a) lo que sugiere que una activación a largo plazo (48h) de GCN2 conduce a una inhibición de eIF2 $\alpha$ .

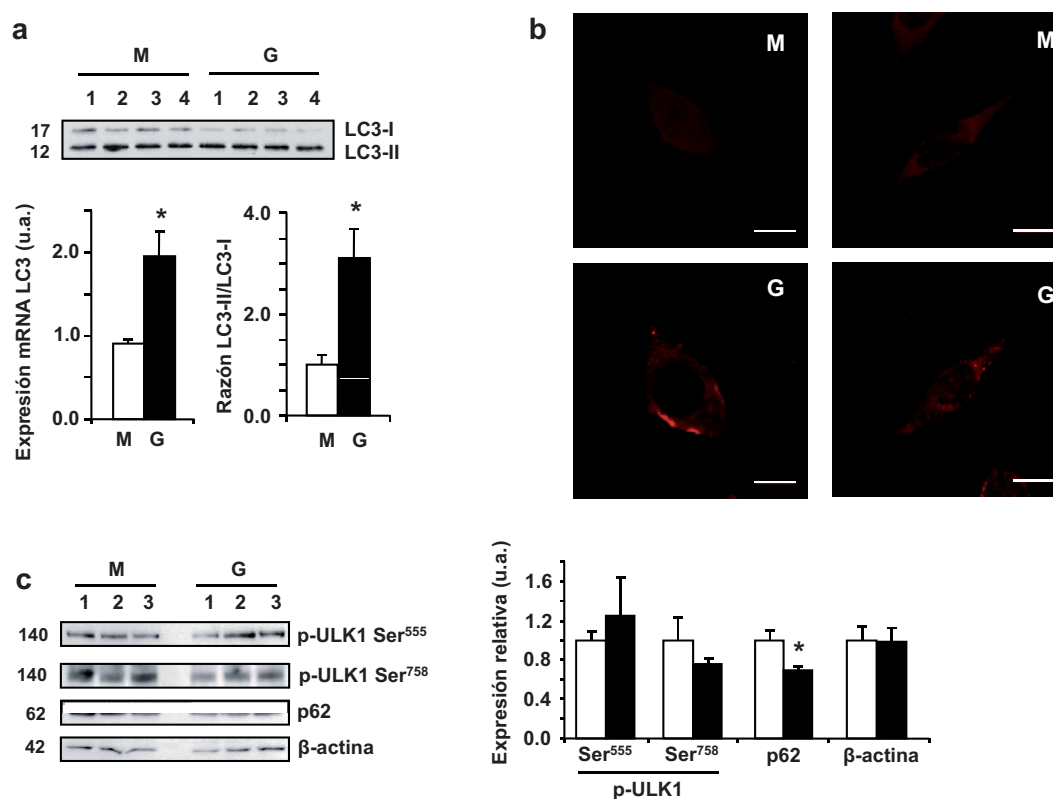
Con objeto de analizar si existe una relación entre las vías de señalización de AMPK y GCN2, se silenciaron las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de AMPK y se estudió la expresión de la forma fosforilada de eIF2 $\alpha$ . El silenciamiento parcial de AMPK  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  (~40-60%) (Fig. 20b) no reveló cambios significativos en la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . Estos datos sugieren que AMPK no está directamente implicada en la regulación de eIF2 $\alpha$ .

En general, estos resultados sugieren que un punto importante en la regulación de la represión de la función bioenergética y metabólica de las mitocondrias y por lo tanto del cambio hacia un fenotipo más agresivo en las células G se ejerce por control de la traducción y está mediado por la activación de las quinasas que responden a estrés, AMPK y GCN2.

#### 4.2.4. La autofagia se activa en las células con fenotipo agresivo G.

La activación de AMPK en células G (Fig. 19) y la consiguiente fosforilación de raptor e inhibición de mTOR (Fig. 20a) implica la activación de la vía de la autofagia en este tipo celular (Sarbasov y cols., 2005). En efecto, consistente con este esquema el análisis de expresión génica realizado mediante la Plataforma Affimetrix, indicaba la activación transcripcional del gen de la autofagia LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3  $\alpha$* ) (aumento de 1.7 en las células G con respecto a las células M,  $p < 0.009$ , (Sanchez-Arago y cols., 2010)). La cuantificación de la expresión del mRNA de LC3 por RT-qPCR cuantitativa confirmó este aumento (Fig. 21a). Por otra parte, los datos de *Western Blot* confirman que la razón de la forma conjugada LC3II respecto a LC3I, que es un marcador de la formación de autofagosomas, es significativamente mayor en el fenotipo agresivo G que en el fenotipo de las células M (Fig. 21a). El incremento en la formación de autofagosomas en las células G se confirmó por microscopia de inmunofluorescencia (Fig. 21b). Por otro lado, no apreciamos cambios significativos en la fosforilación de la Ser-555 de ULK1 (*Serine/threonine-protein kinase ULK1*) (Fig. 21c) ni en la defosforilación de su Ser-758 en las células G (Fig. 21c), cambios que serían consistentes con la activación de la autofagia mediada por la inhibición de mTOR. Sin embargo, sí se observó un descenso significativo en el contenido celular del marcador de autofagia p62 (*Nucleoporin p62*) en las células G (Fig. 21c). Podemos concluir que en células G se produce la activación de la autofagia como una estrategia adicional de la célula cancerosa para sobrevivir y mediar los cambios fenotípicos que acompañan a la adquisición de un comportamiento agresivo en

respuesta a un estrés bioenergético.

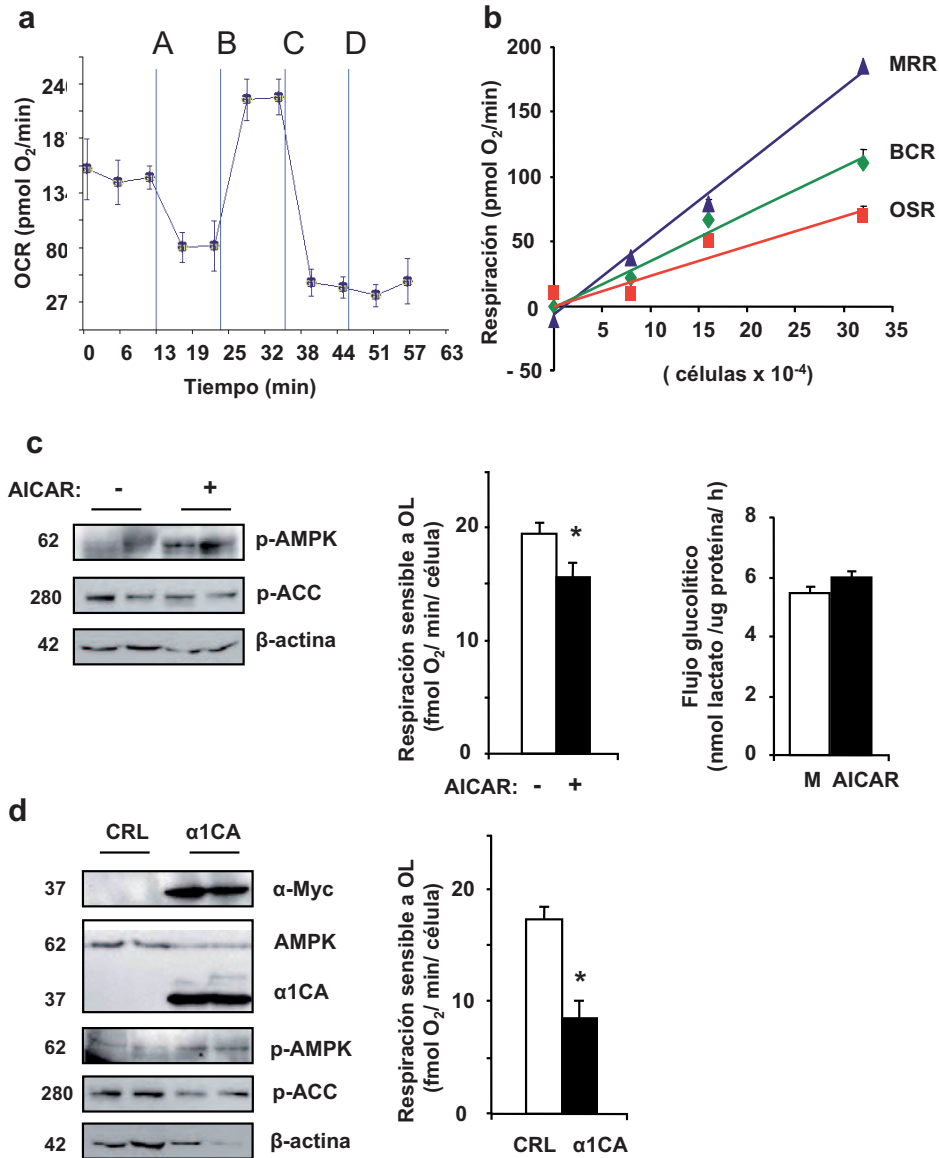


**Figura 21. La inhibición de mTOR promueve la activación de la autofagia.** Las células HCT116 se trataron con OL (barras negras, G) o se dejaron sin tratar (barras blancas, M). **a.** Se extrajo el RNA total de las células y se analizó por RT-qPCR la cantidad relativa del mRNA de LC3. Las barras representan la media  $\pm$ SEM de tres experimentos distintos. Análisis por *western-blot* de la expresión de LC3-I y su forma conjugada LC3-II en cuatro preparaciones distintas (líneas 1-4) de células M y G. La razón LC3-II/LC3-I se normalizó por el valor de la media en las células M. Las barras representan la media  $\pm$ SEM de cuatro determinaciones. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a M. **b.** Microscopía de fluorescencia de células M y G marcadas con el anticuerpo de LC3. Las imágenes de las células G muestran la presencia de autofagosomas (marcaje en rojo). Barra, 10  $\mu$ m. **c.** Análisis por *western-blot* de la expresión de las proteínas p-ULK Ser<sup>555</sup>, p-ULK Ser<sup>758</sup>, p62 y  $\beta$ -actina en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3) de células M y G. Los histogramas muestran la cuantificación de las bandas normalizadas por el valor de la media en las células M. Los resultados representan la media  $\pm$ SEM de al menos tres determinaciones distintas. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a M.

#### 4.2.5. La activación de AMPK promueve la inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial.

Para estudiar el efecto de la activación de la vía de AMPK en la bioenergética celular primero se determinó el consumo de oxígeno de las células HCT116 (Fig. 22a). Los resultados muestran un experimento representativo del consumo de oxígeno de estas células después de la adición secuencial de oligomicina (A), dinitrofenol (B), rotenona (C) y antimicina (D) (Fig. 22a). Los resultados ilustran la respiración basal y su inhibición en respuesta al bloqueo de la fosforilación oxidativa (A), la estimulación de la respiración en respuesta a un desacoplante mitocondrial (B) y la inhibición de la respiración en respuesta

a los inhibidores de la cadena respiratoria, (C) y (D). Además, los datos de la Fig. 22b muestran la respuesta lineal de la velocidad de respiración máxima (MRR), basal (BCR) y la sensible a oligomicina (OSR) con respecto al número de células plaqueadas.



**Figura 22. La activación de AMPK promueve la inhibición de la fosforilación oxidativa.** **a.** Las células M se plaquearon a distinta densidad en placas especiales de 24 pocillos. La tasa de consumo de oxígeno (OCR) se determinó utilizando el analizador de flujo extracelular XF24 (*Seahorse*) tras la adición secuencial a las células de: A (6 μM OL), B (0.75 mM DNP), C (1 μM Rotenona) y D (1 μM Antimicina). **b.** La gráfica representa la respuesta lineal de la MRR (tasa de respiración máxima), BRR (tasa de respiración basal) y OSR (respiración sensible a oligomicina) a distintas densidades celulares. **c.** El tratamiento de las células HCT116 con 0.1 mM de AICAR (48h) promueve un descenso significativo de la OSR (barras negras) al comparar con las células sin tratar (barras blancas) sin propiciar cambios significativos en el flujo glucolítico de las células. **d.** Análisis por *western-blot* de la sobre-expresión del mutante de AMPK (α1CA) con los anticuerpos anti-Myc-tag y anti-AMPK. La sobre-expresión de α1CA promueve la inhibición de la OSR (barras negras) cuando se comparan con las células transfectadas con un plásmido control (CRL) (barras blancas). En la figura se muestran *western-blot* representativos de la expresión de p-AMPK, p-ACC y β-actina después del tratamiento con AICAR (**c**) y después de sobre-expresarse α1CA (**d**). Los resultados representan la media ±SEM de tres experimentos distintos. \* p < 0.05 al comparar frente a M.

La activación de la vía de AMPK mediante el tratamiento de las células HCT116 con fenotipo M con 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- $\beta$ -4-ribofuranoside (AICAR), un análogo del AMP que se usa frecuentemente como activador de esta vía, promovió un aumento de la fosforilación de AMPK (Fig. 22c) y un descenso significativo en la OSR en células HCT116 (Fig. 22c). Sin embargo, AICAR no produjo ningún efecto en el flujo glucolítico de las células (Fig. 22c). AICAR se usó a una concentración de 0.1 mM porque en los experimentos de titulación del compuesto para ver el efecto que éste tenía en la proliferación de las células HCT116 indicaron una alta toxicidad por encima de estas concentraciones.

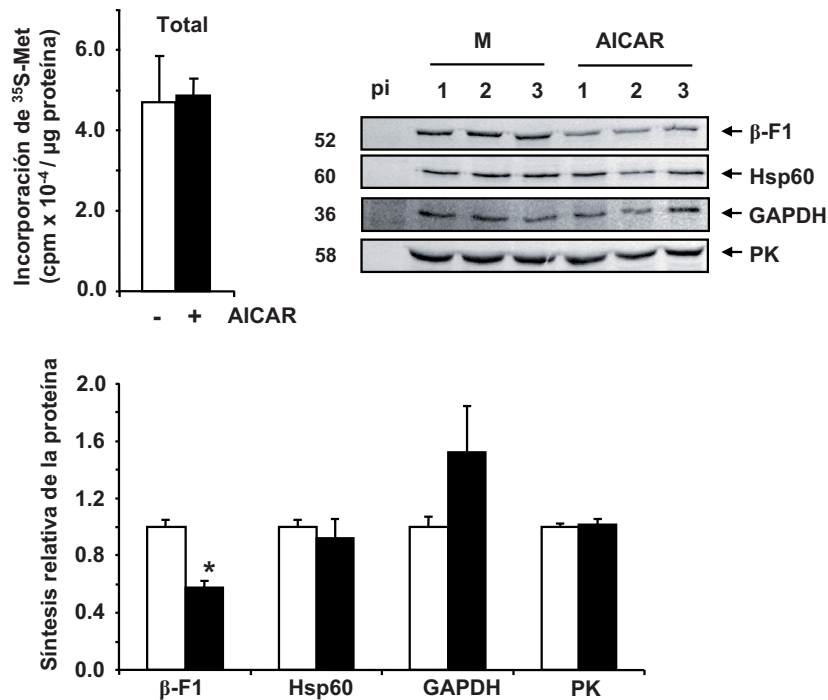
Por otro lado, sobre-expresamos un mutante de AMPK que mantiene a la subunidad  $\alpha 1$  de la proteína constitutivamente activa ( $\alpha 1$ CA, T172D), y además no es dependiente de las subunidades reguladoras para activar la vía de AMPK (Fryer y cols., 2002). La sobre-expresión de  $\alpha 1$ CA en células HCT116 promovió la fosforilación de AMPK (Fig. 22d) y consecuentemente condujo a una inhibición de la OSR en comparación con las células no transfectadas (Fig. 22d).

En su conjunto, estos resultados indican que la activación farmacológica o molecular de AMPK inhibe parcialmente la actividad de la ATP sintasa mitocondrial. Es de destacar que ni la sobre-expresión de  $\alpha 1$ CA (Fig. 22d) ni el tratamiento con AICAR (Fig. 22c) afectan a la fosforilación de ACC, enfatizando la relevancia de la lipogénesis en las células de carcinoma colorrectal y sugiriendo la existencia de algún mecanismo que impide en este tipo de células la fosforilación de ACC por AMPK.

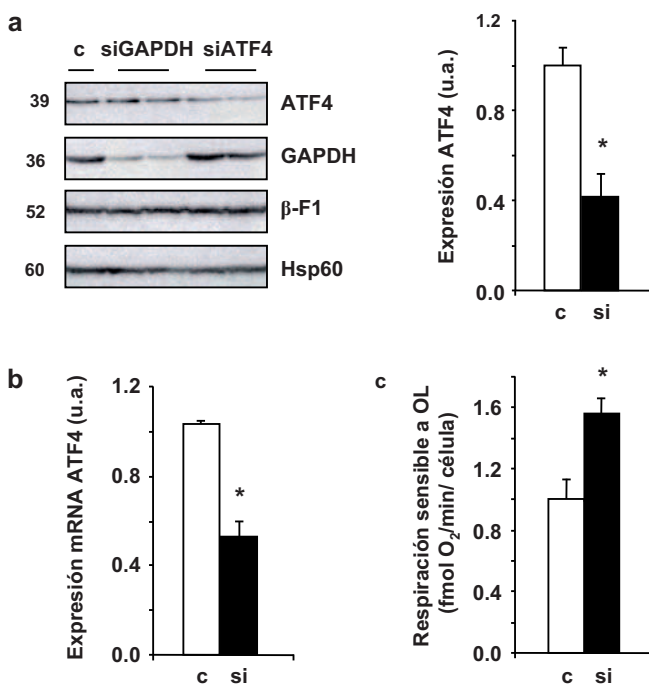
Para confirmar que la activación de AMPK participa en el control de la fosforilación oxidativa en las células de carcinoma colorrectal estudiamos el efecto de AICAR en la velocidad inicial de síntesis de  $\beta$ -F1-ATPasa (Fig. 23). Los resultados demostraron que la activación de AMPK reduce significativamente la velocidad inicial de síntesis de  $\beta$ -F1-ATPasa en ausencia de cambios significativos en la síntesis de Hsp60, GAPDH y PK (Fig.23). Estos resultados indican que la activación de AMPK participa en la represión de la diferenciación bioenergética de la mitocondria en cáncer de colon.

Para poder demostrar la implicación de la vía GCN2-ATF4 en la inhibición de la actividad bioenergética de la mitocondria, determinamos el efecto que tenía el silenciamiento de ATF4 en la respiración de las células M (Fig 24). Los resultados muestran como el silenciamiento de ATF4, tanto a nivel de mRNA (Fig. 24b) como de proteína (Fig. 24a), promueve un incremento significativo en la OSR (Fig. 24c), evidenciando la participación de esta vía en promover la represión de la actividad bioenergética de la mitocondria en cáncer de colon.





**Figura 23. La activación de AMPK conduce a la inhibición de la síntesis de β-F1-ATPasa.** a. Las células HCT116 con fenotipo M se trataron con 0.1 mM de AICAR (48h) (barras negras) o se dejaron sin tratar (barras blancas). Tras realizar un marcaje metabólico de 40 minutos con <sup>35</sup>S-metionina se determinó la velocidad inicial de síntesis *in vivo* de las proteínas β-F1, Hsp60, GAPDH y PK mediante inmunoprecipitación de 100 µg de proteína en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3). La proteína sintetizada se visualizó tras el fraccionamiento de los inmunoprecipitados en geles de poliacrilamida-SDS (9%). Se determinó la incorporación de radiactividad total a proteína mediante precipitación con TCA. Los histogramas representan la media ±SEM de tres experimentos independientes normalizados por el valor de la media en las células control. pi: inmunoprecipitados con IgGs de ratón no específicas. \* p < 0.05 al comparar frente a las células control.



**Figura 24. El silenciamiento de ATF4 estimula la función bioenergética de la mitocondria.** a. Análisis por *western-blot* de la expresión de ATF4, GAPDH, β-F1 y Hsp60 después del silenciamiento de GAPDH (siGAPDH) y ATF4 (siATF4). Se utilizó un siRNA control (c). Los siRNAs se transfectaron a una concentración final de 30 nM y el fenotipo se analizó 48h post-transfección. Los histogramas muestran la cuantificación de las bandas normalizadas por el valor de la media en las células control. b. Se extrajo el RNA total de las células y se analizó por RT-qPCR la cantidad relativa del mRNA de ATF4. c. El silenciamiento de ATF4 promueve un incremento en la OSR al comparar con las células control. Los resultados representan la media ±SEM de tres (a y b) o cinco (c) experimentos distintos. \* p < 0.05 al comparar frente a las células control.

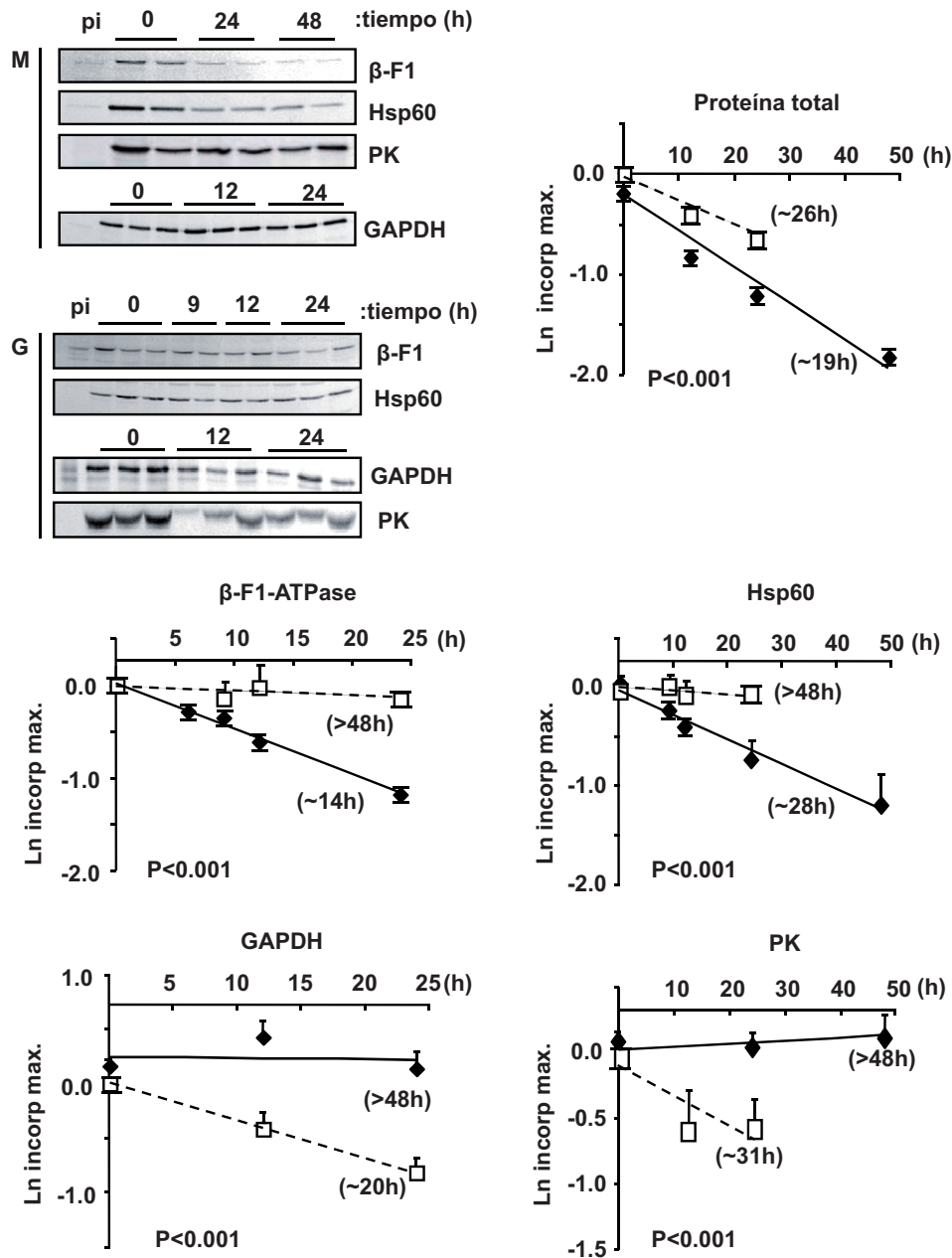
#### 4.2.6. La represión de la función mitocondrial en las células tumorales requiere del ajuste en el recambio de las proteínas implicadas en el metabolismo energético.

Los resultados previos muestran que es necesaria una regulación diferencial de la síntesis de las proteínas mitocondriales y glucolíticas para conseguir la reprogramación metabólica compatible con la adquisición del fenotipo agresivo. Nos propusimos estudiar si estos cambios correspondían también con cambios en la degradación y vida media de las proteínas del metabolismo energético. Como paradigmas, se analizó la vida media de las proteínas mitocondriales,  $\beta$ -F1-ATPasa, Hsp60 y de las enzimas glucolíticas, GAPDH y PK en células M y G mediante experimentos de pulso y caza convencionales (Fig. 25).

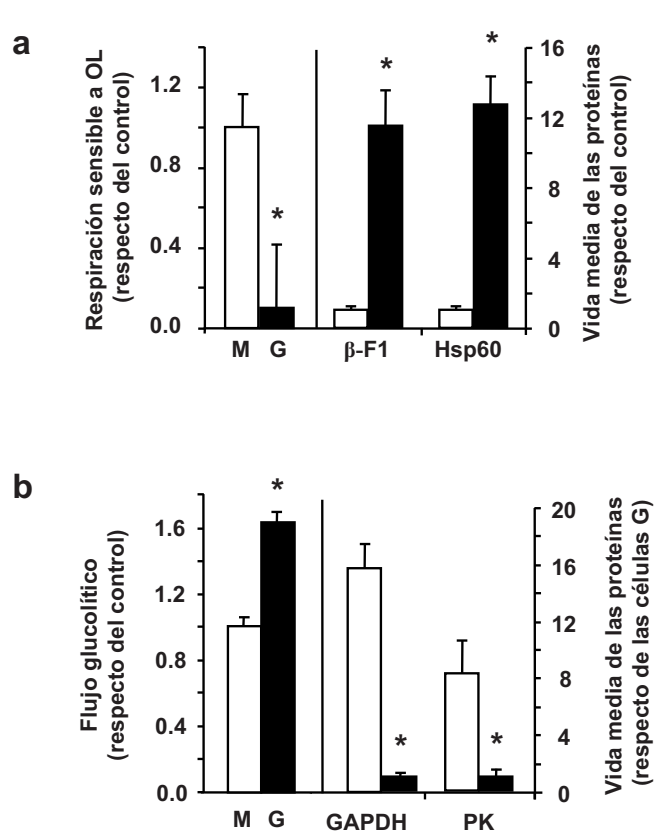
En la figura 25, se puede observar como la caída de la radiactividad del total de proteínas en las células M y G no varía en gran medida a lo largo del tiempo. El cálculo de la vida media mediante la representación del ln de la señal normalizada frente al tiempo, reveló que la vida media del total de proteínas era de 19h en las células M y de 26h en las células G. En las células M, que tienen una activa fosforilación oxidativa (Fig. 10d), se produce una caída de la radioactividad en las proteínas mitocondriales,  $\beta$ -F1-ATPasa y Hsp60 a las 24 horas, indicando que las proteínas mitocondriales tienen un recambio alto en estas células (Fig. 25). Por el contrario, en las células M donde la glucólisis no está muy activa (Fig. 10c), no se observa una caída de la radiactividad de las enzimas glucolíticas GAPDH y PK (Fig. 25). La señal es estable hasta las 24h en el caso de GAPDH y hasta las 48h en el caso de PK indicando que estas proteínas tienen un recambio muy lento en las células M (Fig. 25). La vida media de las proteínas mitocondriales  $\beta$ -F1-ATPasa y Hsp60 en células M es de 14h y 28h respectivamente (Fig. 25). En el caso de las enzimas glucolíticas, GAPDH y PK el cálculo de la vida media fue mayor de 48h en los dos casos (Fig. 25). En las células G que presentan una fosforilación oxidativa mucho menos activa (Fig. 10d), no se observa una caída de la radioactividad en las proteínas mitocondriales  $\beta$ -F1-ATPasa y Hsp60, lo que indica que en las células G el recambio de estas proteínas es más lento (Fig. 25). De hecho el cálculo de la vida media reveló que la vida media se estabilizaba mucho, pasando a ser mayor de 48h en los dos casos (Fig. 25). Por el contrario, se puede observar una fuerte caída de la radiactividad a las 12h de las enzimas glucolíticas GAPDH y PK en las células G que tienen un fenotipo más glucolítico (Fig. 10c), es decir que tienen un recambio mucho más alto en esta condición (Fig. 25). La vida media de GAPDH y PK es de 20h y 31h respectivamente en las células G, mientras que es mayor de 48h en las células M (Fig. 25).

En la figura 26a se resumen los datos y se puede observar como en las células M que tienen actividad mitocondrial, las proteínas mitocondriales,  $\beta$ -F1-ATPasa y Hsp60, tienen una vida media mucho menor que en las células G que tienen menor actividad de la fosforilación oxidativa (Fig. 26a). La vida media de las proteínas mitocondriales en las células G se incrementa aproximadamente 12 veces con respecto a la vida media en las células M (Fig. 26a). Por otro lado, una glucólisis menos activa en las células M respecto

de G, conduce a una estabilización de las enzimas glucolíticas de 16 veces en el caso de GAPDH y de 8 veces en el caso de PK en células M (Fig. 26b). Es decir, las células G presentan una vida media mucho menor de las enzimas glucolíticas que las células M (Fig. 26b).



**Figura 25. La adaptación metabólica requiere cambios en la regulación de la vida media de las proteínas implicadas en el metabolismo energético.** Las células HCT116 se trataron con OL (líneas punteadas, G) o se dejaron sin tratar (líneas continuas, M). Se determinó la vida media del total de proteínas mediante precipitación con TCA y en concreto de las proteínas β-F1, Hsp60, GAPDH y PK por inmunoprecipitación mediante experimentos de pulso y caza. Tras el marcaje metabólico con <sup>35</sup>S-metionina de 1h se recogieron las células a los distintos tiempos indicados en la figura (0, 9, 12, 24 y 48h). Las gráficas muestran la representación del Ln de la señal de la banda correspondiente normalizada por el valor de la media en el tiempo 0h para hacer el cálculo de la vida media. Los resultados representan la media ±SEM de al menos tres determinaciones independientes. p< 0.001 al comparar las distintas pendientes frente a las células control por correlación lineal usando el software SPSS.



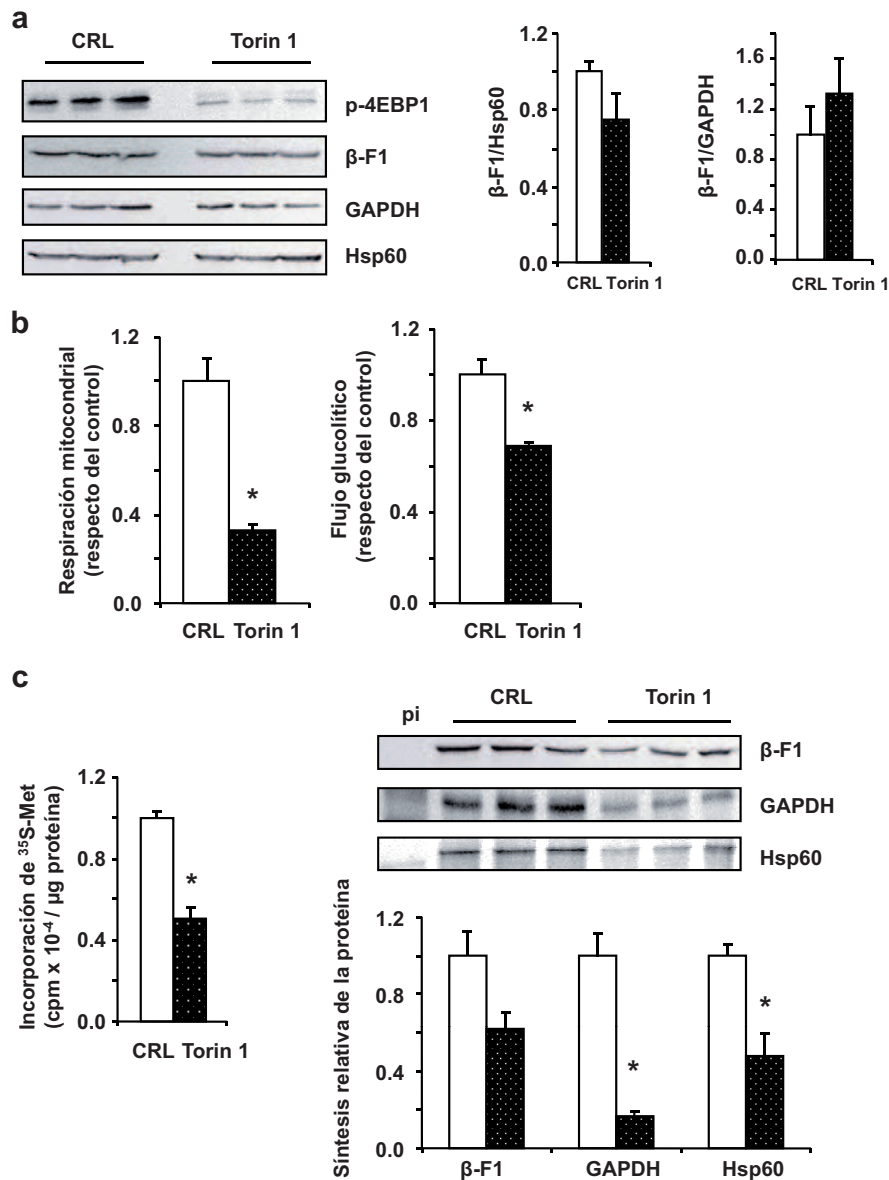
Estos resultados enfatizan la necesidad de una regulación diferencial de la vida media de las proteínas implicadas en el metabolismo energético para adquirir un fenotipo agresivo.

#### 4.2.7. La inhibición de mTOR reprime la síntesis global de proteínas.

Con objeto de analizar si mTOR es la proteína clave en la regulación diferencial de síntesis y degradación de proteínas implicadas en el metabolismo energético, las células HCT116 se trataron con Torin 1 que es un inhibidor muy específico de mTOR. El tratamiento de las células con Torin 1 promovió la consecuente inhibición en la fosforilación de la proteína 4EBP1 (Fig. 27a). Sin embargo la inhibición de mTOR no condujo a cambios significativos en el análisis de las razones  $\beta$ -F1/Hsp60 y  $\beta$ -F1/GAPDH (Fig. 27a) al comparar con las células sin tratar. Por otro lado, el tratamiento con Torin 1 produjo una represión significativa de la función mitocondrial (Fig. 27b) y de la actividad glucolítica de las células (Fig. 27b) al comparar con las células control.

El estudio de la velocidad inicial de síntesis de las proteínas en presencia de Torin 1, indica una represión global de la síntesis de proteínas celulares de aproximadamente un 50% con respecto a las células sin tratar (Fig. 27c). Las proteínas mitocondriales  $\beta$ -F1-ATPasa y Hsp60 y la enzima glucolítica GAPDH presentan una reducción significativa en la velocidad inicial de síntesis en presencia de Torin 1 en comparación con las células control (Fig. 27c).

En su conjunto, estos resultados junto a los descritos en la sección 4.2.3 sugieren que mTOR puede participar en la regulación diferencial de la síntesis y presumiblemente de la degradación de proteínas mitocondriales y glucolíticas en las células de carcinoma de colon ya que como se puede observar, la actividad de mTOR es muy importante para el balance de la traducción de proteínas celulares.

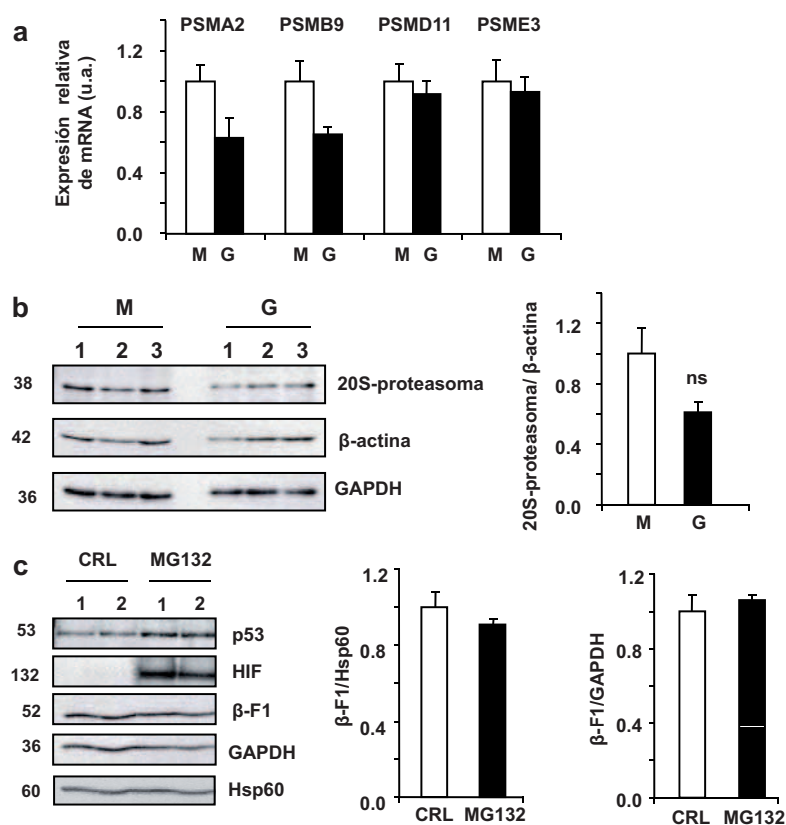


**Figura 27. La inhibición de mTOR media la represión de la traducción global de proteínas celulares.**

Las células se trataron con 250 nM de Torin 1 durante 24h (barras negras) o se dejaron sin tratar (barras blancas). **a.** Análisis por *western-blot* de la expresión de p-4EBP1,  $\beta$ -F1, GAPDH y Hsp60 después del tratamiento con Torin 1. Los histogramas representan los índices bioenergéticos  $\beta$ -F1/GAPDH y  $\beta$ -F1/Hsp60. **b.** El tratamiento con Torin 1 (barras negras) promueve la inhibición de la respiración mitocondrial y del flujo glucolítico en comparación con las células sin tratar (CRL, barras blancas). **c.** Se determinó la velocidad inicial de síntesis *in vivo* de las proteínas  $\beta$ -F1, Hsp60 y GAPDH en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3). Tras el marcaje metabólico de 40 minutos con  $^{35}\text{S}$ -metionina se inmunoprecipitaron las proteínas y se visualizó la proteína sintetizada por fluorografía de geles de poliacrilamida-SDS (9%). La incorporación a proteína total se realizó por precipitación con TCA. Los histogramas representan la media  $\pm$ SEM de tres experimentos independientes normalizados por el valor de la media en las células control. pi: inmunoprecipitados con IgGs de ratón no específicas. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a las células control.

#### 4.2.8. El proteasoma no parece mediar cambios en el fenotipo de las células G.

El análisis transcriptómico de las células M y G sugería la represión global de la vía del proteasoma ya que muchos de los genes que codifican las subunidades del complejo mostraban una represión transcripcional en las células G (Sanchez-Arago y cols., 2010). Sin embargo, la cuantificación de la expresión del mRNA de algunos de estos genes por RT-qPCR (Fig. 28a), no mostró un descenso significativo en el contenido celular de los mismos. El estudio de la expresión del núcleo 20S del proteasoma por *western blot* tampoco mostró diferencias significativas del complejo entre las células M y G (Fig 28b). De acuerdo con estos datos, el tratamiento de las células M con el inhibidor del proteasoma, MG132 no mostró cambios significativos en la expresión de las proteínas  $\beta$ -F1-ATPasa, Hsp60 y GAPDH mientras que sí se observa una clara acumulación de HIF1 $\alpha$  y p53, dos proteínas que se degradan vía proteasoma (Fig 28c). En su conjunto, estos resultados sugieren que la regulación del proteasoma no está implicada en la reprogramación metabólica de las células de carcinoma de colon.

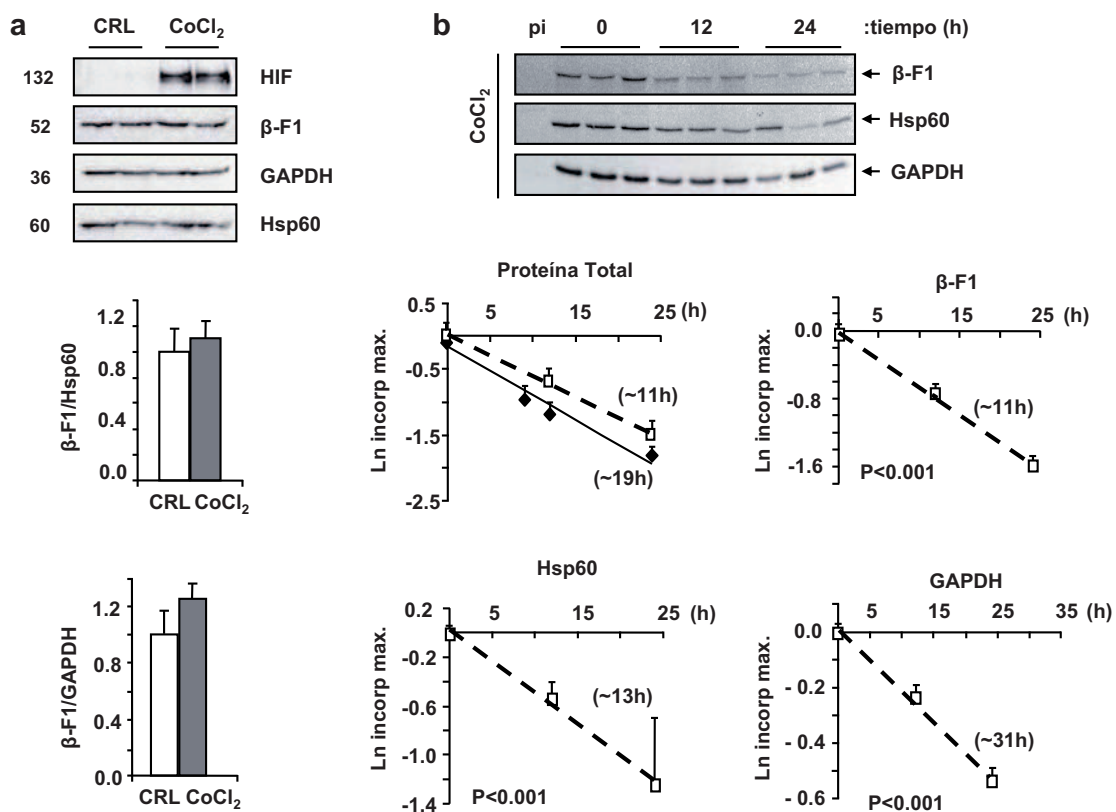


**Figura 28. El proteasoma no parece estar implicado en la regulación del metabolismo energético.**

**a.** Se extrajo el RNA total de las células y se analizó por RT-qPCR la cantidad relativa del mRNA de las subunidades del proteasoma: PSMA2, PSMB9, PSMD11 y PSME3. Las barras representan la media  $\pm$ SEM de tres experimentos distintos. **b.** Análisis por *western-blot* de la expresión del núcleo 20S del proteasoma y de las proteínas GAPDH y  $\beta$ -actina en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3) de células M y G. El histograma muestra la razón 20S-proteasoma/ $\beta$ -actina normalizada por el valor de la media en las células M. ns, no significativo. **c.** Se analizó la expresión de las proteínas p53, HIF1 $\alpha$ ,  $\beta$ -F1, GAPDH y Hsp60 en dos preparaciones diferentes (líneas 1-2) de células tratadas con 40  $\mu$ M del inhibidor del proteasoma MG132 durante 8h (barras negras) o sin tratar (CRL, barras blancas). La acumulación de p53 y de HIF1 $\alpha$  son controles positivos del tratamiento con MG132 ya que ambas proteínas se degradan vía proteasoma. Los histogramas representan los índices bioenergéticos  $\beta$ -F1/GAPDH y  $\beta$ -F1/Hsp60.

4.2.9. HIF1 $\alpha$  no es el responsable de la represión de la diferenciación bioenergética de las mitocondrias.

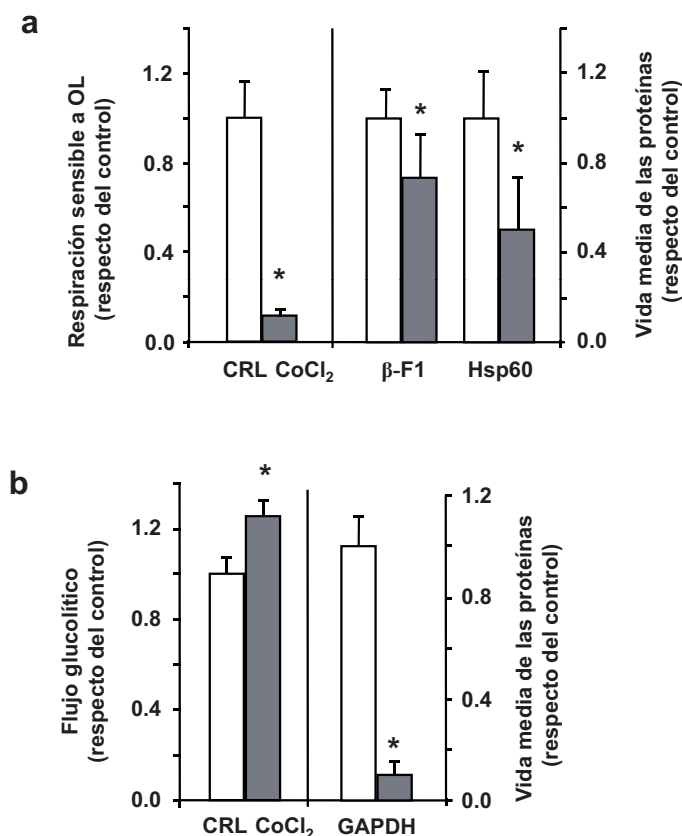
El factor de transcripción HIF1 $\alpha$  juega un papel fundamental en la adaptación metabólica de las células en presencia de hipoxia y en la progresión tumoral (Semenza, 2012). Aunque no se observaron diferencias en la expresión de HIF1 $\alpha$  entre las células M y G (Fig. 19) quisimos investigar la supuesta participación de HIF1 $\alpha$  en el mecanismo de adaptación de las células con el fenotipo agresivo. Con este fin, las células HCT116 se trataron con CoCl<sub>2</sub> para promover la estabilización de HIF1 $\alpha$  (Fig. 19 y Fig. 29a). La estabilización de HIF1 $\alpha$  (Fig. 29a) no fue acompañada de cambios en el fenotipo bioenergético de las células tal como indica el análisis de las razones  $\beta$ -F1/Hsp60 y  $\beta$ -F1/GAPDH (Fig. 29a).



**Figura 29. HIF1 $\alpha$  no media la reprogramación metabólica en las células de carcinoma colorrectal.** Las células HCT116 se trataron con 200  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub> durante 6h (barras grises) para inducir la expresión de HIF1 $\alpha$  siempre teniendo como control células sin tratar (barras blancas). **a.** Análisis por *western-blot* de la expresión de HIF1 $\alpha$ ,  $\beta$ -F1, GAPDH y Hsp60 partiendo de 20  $\mu$ g de proteína después del tratamiento con CoCl<sub>2</sub>. Los histogramas representan los índices bioenergéticos  $\beta$ -F1/GAPDH y  $\beta$ -F1/Hsp60 en células tratadas con CoCl<sub>2</sub> y en células control (CRL). **b.** Se determinó la vida media del total de proteínas por precipitación con TCA y en concreto de las proteínas  $\beta$ -F1, Hsp60 y GAPDH por inmunoprecipitación mediante experimentos de pulso y caza en células tratadas con CoCl<sub>2</sub> (líneas discontinuas). Se recogieron las células a los distintos tiempos indicados en la figura (0, 12 y 24h). La línea continua de la gráfica del total de proteínas representa la vida media de las proteínas en las células control. Las gráficas muestran la representación del Ln de la señal normalizada por el valor de la media en el tiempo 0h para hacer el cálculo de la vida media. Los resultados representan la media  $\pm$ SEM de al menos tres determinaciones independientes.  $p < 0.001$  al comparar las distintas pendientes frente a las células control por correlación lineal usando el software SPSS.

El estudio de la vida media en células tratadas con  $\text{CoCl}_2$  frente a células control indicó un mayor recambio del total de las proteínas celulares en las células tratadas con  $\text{CoCl}_2$ , ya que era de 11h frente a las 19h de las células control (Fig. 29b). Como se puede observar en la figura 29b hay una caída en la radioactividad de todas las proteínas que se han estudiado a las 12h. La vida media de  $\beta$ -F1 en células tratadas con  $\text{CoCl}_2$  es de 11h, significativamente menor a la vida media de  $\beta$ -F1 en las células control que es de 14h (Fig. 25 y 29b). Por otro lado, Hsp60 tiene una vida media de 13h en las células tratadas con  $\text{CoCl}_2$ , la mitad de la vida media (28h) de Hsp60 en las células control (Fig. 25 y 29b). GAPDH también tiene una vida media menor (31h) en las células tratadas con  $\text{CoCl}_2$  cuando se compara con la vida media en las células control (>48h). Estos resultados indican que el tratamiento con  $\text{CoCl}_2$  induce un aumento en el recambio global de las proteínas celulares.

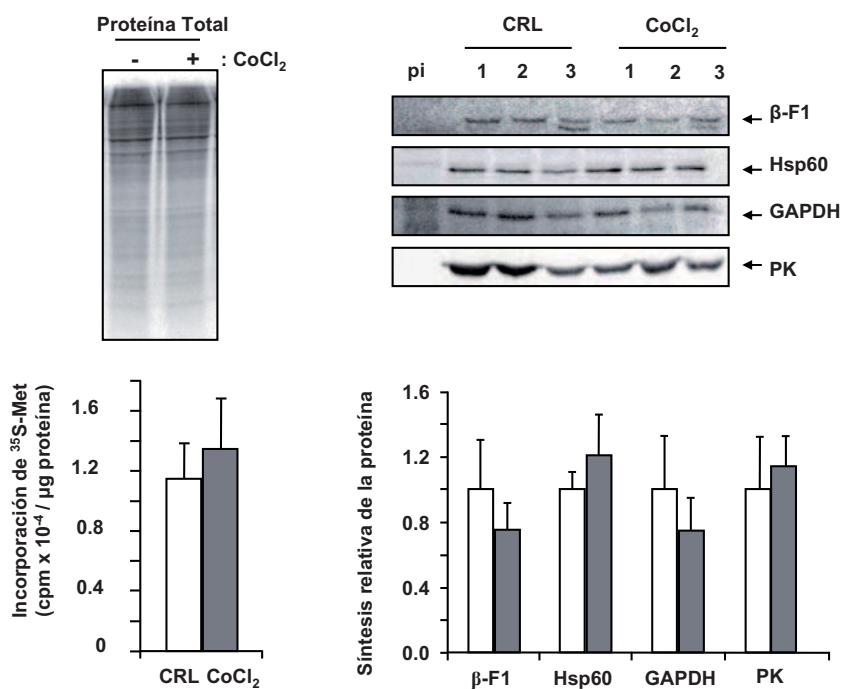
En la figura 30a podemos ver como el tratamiento con  $\text{CoCl}_2$  produce una disminución de la actividad de la fosforilación oxidativa. Sin embargo en este caso, no se produce una estabilización de la vida media de las proteínas mitocondriales, sino que se da un descenso de un 20% en la vida media de  $\beta$ -F1-ATPasa y del 50% en la vida media de Hsp60 (Fig. 30a). El tratamiento con  $\text{CoCl}_2$  induce la actividad glucolítica de la célula (Fig. 30b) y en este caso sí que podemos ver como una mayor glucólisis correlaciona con un descenso de hasta 9 veces en la vida media de GAPDH (Fig. 30b).



**Figura 30. El tratamiento con  $\text{CoCl}_2$  aumenta el recambio de las proteínas implicadas en el metabolismo energético. a.** El tratamiento de las células con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  durante 6h (barras grises) promueve la inhibición de la OSR en comparación con las células sin tratar (CRL, barras blancas). Representación del descenso en la vida media de las proteínas  $\beta$ -F1 y Hsp60 en las células tratadas con  $\text{CoCl}_2$  con respecto a la vida media en las células control. **b.** El tratamiento de las células con  $\text{CoCl}_2$  (barras grises) promueve un aumento del flujo glucolítico en comparación con las células sin tratar (CRL, barras blancas). Representación del descenso en la vida media de la proteína GAPDH en las células tratadas con  $\text{CoCl}_2$  con respecto a las células control. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a las células control.



Se estudiaron las velocidades iniciales de síntesis de las proteínas  $\beta$ -F1, Hsp60, GAPDH y PK después de un pulso corto con  $^{35}\text{S}$ -metionina en ausencia y presencia de  $\text{CoCl}_2$ . No se observaron diferencias significativas en la velocidad inicial de síntesis del total de proteínas al comparar ambas condiciones (Fig. 31). Tampoco se observaron diferencias significativas ni en las velocidades iniciales de síntesis de las proteínas mitocondriales  $\beta$ -F1 y Hsp60 ni de las dos enzimas glucolíticas GAPDH y PK (Fig. 31).



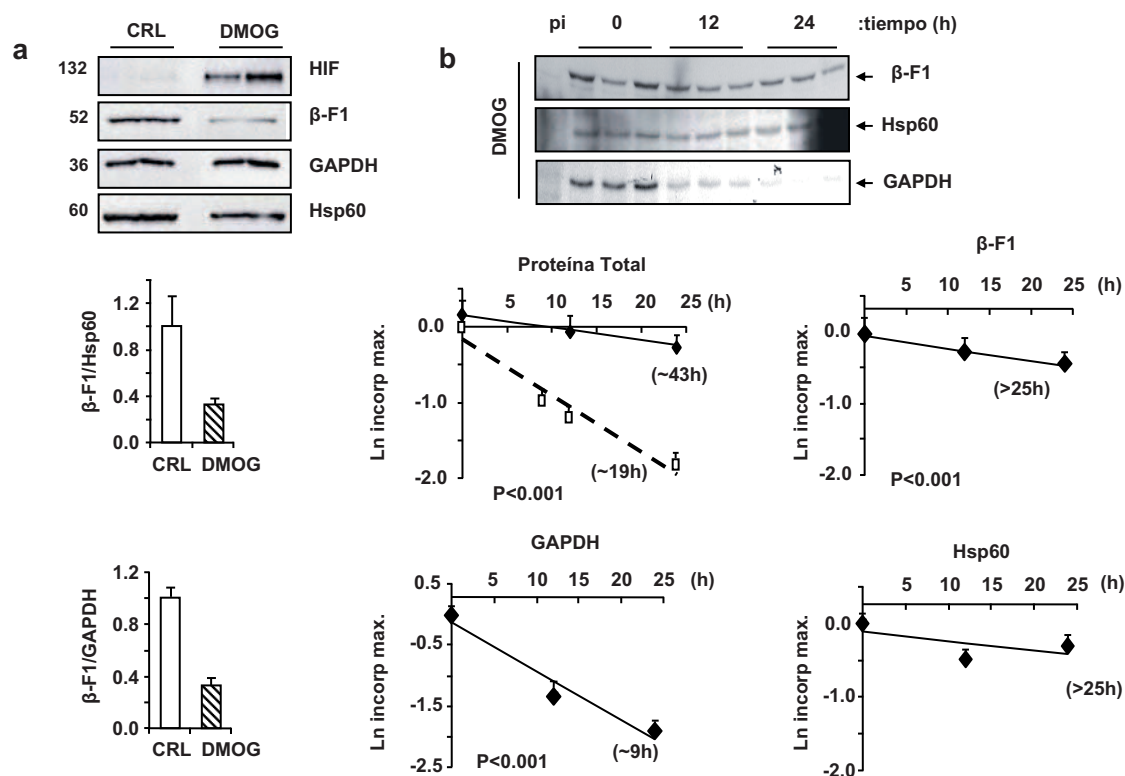
**Figura 31. El tratamiento con  $\text{CoCl}_2$  no afecta a la velocidad inicial de síntesis de las proteínas implicadas en el metabolismo energético.** Las células HCT116 se trataron con  $200 \mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  durante 6h (barras grises) teniendo como control células sin tratar (CRL, barras blancas). Se realizó un marcaje metabólico de 40 minutos con  $^{35}\text{S}$ -metionina. A continuación se inmunoprecipitaron las proteínas  $\beta$ -F1, Hsp60, GAPDH y PK partiendo de  $100 \mu\text{g}$  de proteína. La proteína sintetizada se visualizó tras el fraccionamiento de los inmunoprecipitados en geles de poliacrilamida-SDS (9%). Se determinó la velocidad inicial de síntesis *in vivo* de las proteínas en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3). La incorporación a proteína total se realizó por precipitación con TCA. Los histogramas representan la media  $\pm$ SEM de tres experimentos independientes normalizados por el valor de la media en las células control. pi: inmunoprecipitados con IgGs de ratón no específicas. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a las células control.

En su conjunto, estos resultados indican que la adaptación metabólica de las células en presencia de  $\text{CoCl}_2$  se produce de manera independiente a la regulación diferencial de la expresión y vida media de las proteínas implicadas en el metabolismo energético. Es decir, que HIF1 $\alpha$  no es el responsable de la reprogramación metabólica en las células de carcinoma colorrectal. Estos resultados son coherentes con los datos de vida media de los proteínas, ya que en ningún caso la vida media de las proteínas estudiadas es menor a

6h que es el tiempo de tratamiento con  $\text{CoCl}_2$ . Además, estos resultados están de acuerdo con estudios previos que demuestran que el  $\text{CoCl}_2$  actúa mediante mecanismos distintos e independientes de la vía mitocondrial de adaptación a hipoxia (Chandel y cols., 1998).

#### 4.2.10. La inhibición de las prolin-hidroxilasas promueve la regulación diferencial de la expresión y de la vida media de las proteínas implicadas en el metabolismo energético.

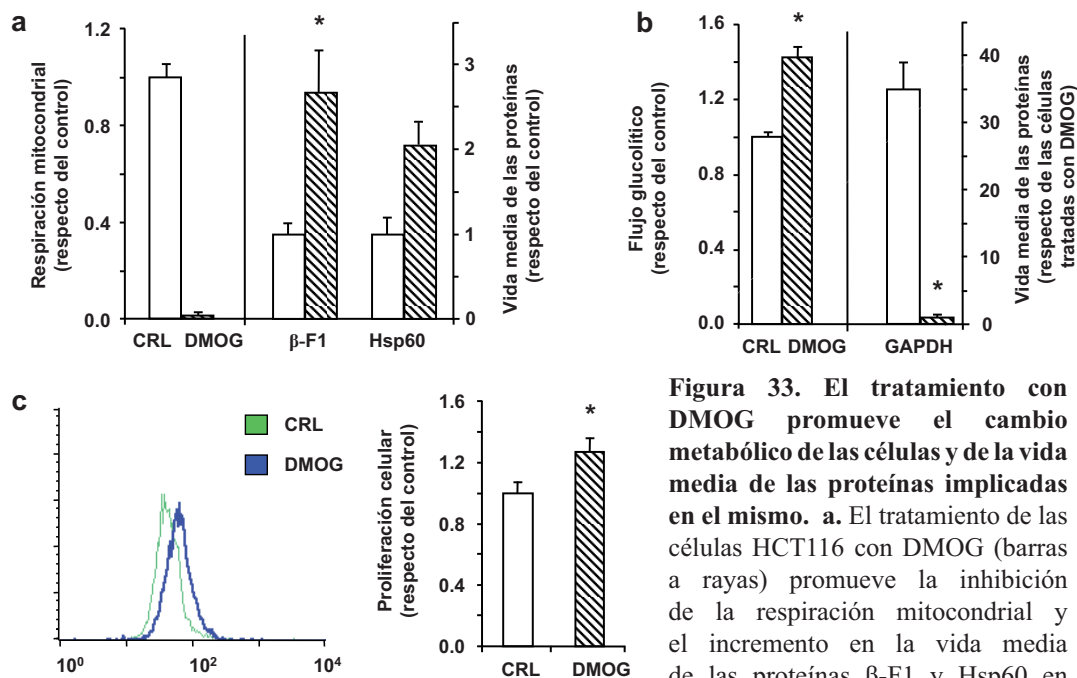
Debido a estos resultados y a que el mecanismo de acción del  $\text{CoCl}_2$  es bastante controvertido, estudiamos el efecto de DMOG, un inhibidor de prolin-hidroxilasas muy específico ya que compite con el 2-oxoglutarato, un co-sustrato necesario para la reacción de la hidroxilación. La inducción de HIF1 $\alpha$  mediante el tratamiento con DMOG durante 24h promovió un cambio metabólico similar al que observamos en las células G ya que conduce a una disminución de las razones  $\beta\text{-F1}/\text{Hsp60}$  y  $\beta\text{-F1}/\text{GAPDH}$  en las células tratadas con DMOG (Fig. 32a).



**Figura 32. La inhibición de prolin-hidroxilasas afecta a la vida media de las proteínas del metabolismo energético celular.** Las células HCT116 se trataron con 1 mM de DMOG durante 24h (barras a rayas) o se dejaron sin tratar (barras blancas). **a.** Análisis por *western-blot* de la expresión de HIF1 $\alpha$ ,  $\beta\text{-F1}$ , GAPDH y Hsp60 después del tratamiento con DMOG. Los histogramas representan los índices bioenergéticos  $\beta\text{-F1}/\text{GAPDH}$  y  $\beta\text{-F1}/\text{Hsp60}$ . **b.** Se determinó la vida media del total de proteínas por precipitación con TCA y en concreto de las proteínas  $\beta\text{-F1}$ , Hsp60 y GAPDH por inmunoprecipitación mediante experimentos de pulso y caza en células tratadas con DMOG (líneas continuas). Se recogieron las células a los distintos tiempos indicados en la figura (0, 12 y 24h). La línea discontinua representa la vida media de las proteínas en las células control. Las gráficas muestran la representación del ln de la señal normalizada por el valor de la media en el tiempo 0h para el cálculo de la vida media. Los resultados representan la media  $\pm$ SEM de al menos tres determinaciones independientes.  $p < 0.001$  al comparar las distintas pendientes frente a las células control por correlación lineal usando el software SPSS.

El estudio de la vida media del total de proteínas en las células tratadas con DMOG indica que están más estabilizadas en las células tratadas con DMOG ya que la vida media es de 43h mientras que en las células control es de 19h (Fig. 32b). En las células tratadas con DMOG se puede observar una caída en la radioactividad de GAPDH a las 12h mientras que la señal de  $\beta$ -F1-ATPasa y de Hsp60 es estable hasta las 24h (Fig. 32b). La vida media de  $\beta$ -F1 y Hsp60 en células tratadas con DMOG es >25h, significativamente mayor a la vida media de  $\beta$ -F1 y Hsp60 en las células control (Fig. 25 y 32b). GAPDH también tiene una vida media menor (9h) en las células tratadas con DMOG cuando se compara con la vida media en las células control (>48h). Es decir, que al igual que ocurría en las células G, las proteínas mitocondriales tienen un recambio mucho más lento en las células tratadas con DMOG (Fig. 32b) y además el tratamiento con DMOG promueve un recambio mayor de la proteína GAPDH (Fig. 32b).

El tratamiento con DMOG conduce a una fuerte represión de la función mitocondrial (Fig. 33a). En estas condiciones, se produce una estabilización de casi 3 veces en la vida media de  $\beta$ -F1-ATPasa y de 2 veces en la vida media de Hsp60 (Fig. 33a). Así mismo, DMOG induce la actividad glucolítica de las células (Fig. 33b). En esta situación, la vida media de GAPDH es 35 veces menor que en las células control (Fig. 33b). El estudio de la proliferación celular mediante la incorporación de EdU en DNA reveló que las células tratadas con DMOG tienen una mayor tasa de proliferación en comparación con las células control (Fig. 33c).

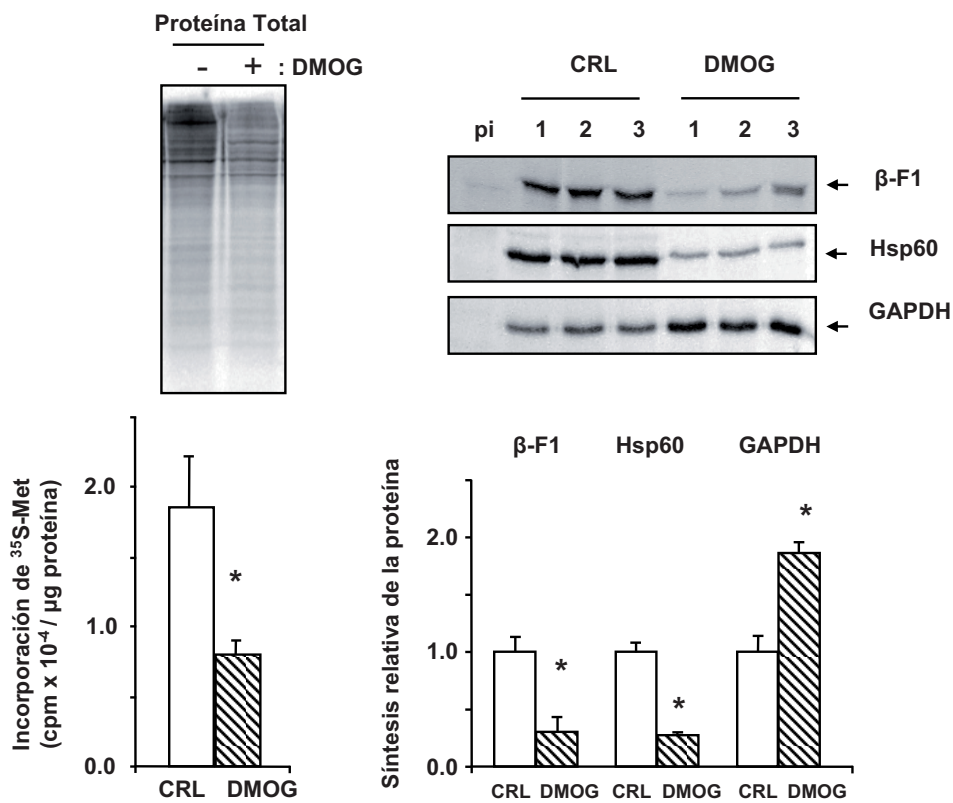


**Figura 33. El tratamiento con DMOG promueve el cambio metabólico de las células y de la vida media de las proteínas implicadas en el mismo. a.** El tratamiento de las células HCT116 con DMOG (barras a rayas) promueve la inhibición de la respiración mitocondrial y el incremento en la vida media de las proteínas  $\beta$ -F1 y Hsp60 en comparación con las células sin tratar (CRL, barras blancas). **b.** El tratamiento con DMOG promueve un aumento del flujo glucolítico y un incremento en la degradación de la proteína GAPDH en comparación con las células sin tratar (CRL). \*  $p < 0.05$  al comparar frente a las células control. **c.** La proliferación celular se determinó por citometría de flujo en células control (verde) y células tratadas con DMOG (azul). El histograma representa la media geométrica de fluorescencia emitida normalizada por el valor de la media en células control. Las barras representan la media  $\pm$ SEM de cuatro determinaciones independientes. \*  $p < 0.06$  al comparar frente al control.

comparación con las células sin tratar (CRL, barras blancas). **b.** El tratamiento con DMOG promueve un aumento del flujo glucolítico y un incremento en la degradación de la proteína GAPDH en comparación con las células sin tratar (CRL). \*  $p < 0.05$  al comparar frente a las células control. **c.** La proliferación celular se determinó por citometría de flujo en células control (verde) y células tratadas con DMOG (azul). El histograma representa la media geométrica de fluorescencia emitida normalizada por el valor de la media en células control. Las barras representan la media  $\pm$ SEM de cuatro determinaciones independientes. \*  $p < 0.06$  al comparar frente al control.

El estudio de la velocidad inicial de síntesis de las proteínas en presencia de DMOG, indica una represión global de la síntesis de proteínas celulares con respecto a las células sin tratar (Fig. 34). Las proteínas mitocondriales  $\beta$ -F1-ATPasa y Hsp60 presentan una reducción significativa en la velocidad inicial de síntesis en presencia de DMOG en comparación con las células control (Fig. 34). Por el contrario, se observó un aumento significativo en la velocidad inicial de síntesis de la enzima glucolítica GAPDH en presencia de DMOG (Fig. 34).

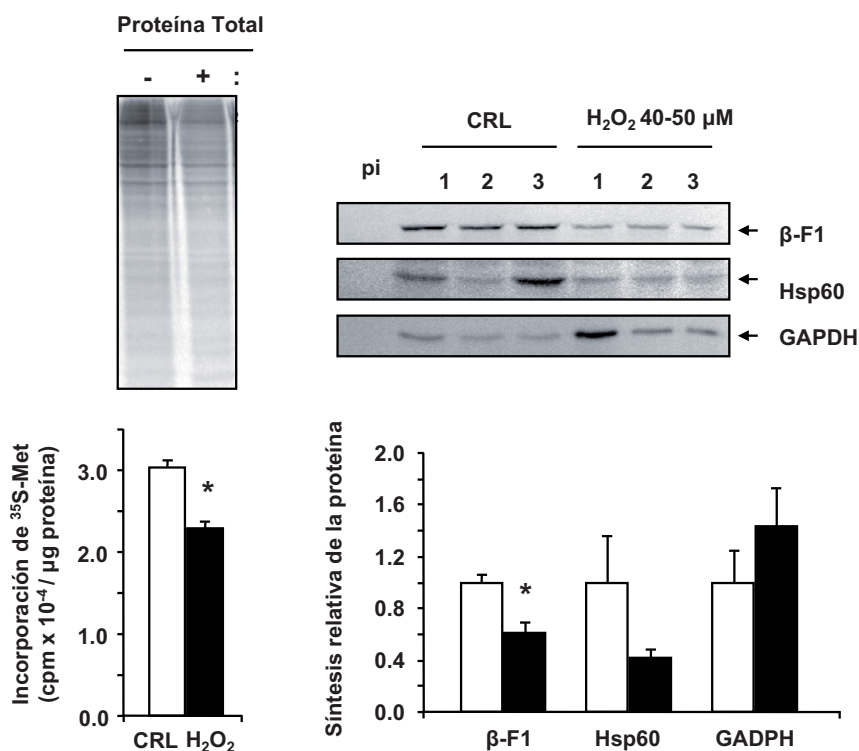
En su conjunto, estos resultados apoyan que el cambio metabólico de las células G implica la represión específica de la traducción de mRNAs que codifican proteínas mitocondriales de forma acoplada a una menor degradación de las mismas. Estos cambios ocurren de forma concurrente con una mayor síntesis y degradación de las proteínas de la vía glucolítica. Además, ponen de manifiesto la enorme relevancia de las prolil-hidroxilasas para regular de forma diferencial la síntesis de las proteínas mitocondriales y glucolíticas en las células de carcinoma de colon.



**Figura 34. El tratamiento con DMOG promueve la inhibición selectiva de la traducción de proteínas mitocondriales.** Las células HCT116 se trataron con 1 mM de DMOG durante 24h (barras a rayas) teniendo como control células sin tratar (CRL, barras blancas). Se realizó un marcaje metabólico de 40 minutos con <sup>35</sup>S-metionina. A continuación se inmunoprecipitaron las proteínas  $\beta$ -F1, Hsp60 y GAPDH partiendo de 100  $\mu$ g de proteína. La proteína sintetizada se visualizó tras el fraccionamiento de los inmunoprecipitados en geles de poliacrilamida-SDS (9%). Se determinó la velocidad inicial de síntesis *in vivo* de las proteínas en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3). La incorporación a proteína total se realizó por precipitación con TCA. Los histogramas representan la media  $\pm$ SEM de tres experimentos independientes normalizados por el valor de la media en las células control. pi: inmunoprecipitados con IgGs de ratón no específicas. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a las células control.

4.2.11. El estrés oxidativo dificulta la síntesis de proteínas mitocondriales favoreciendo la adquisición del fenotipo agresivo tumoral.

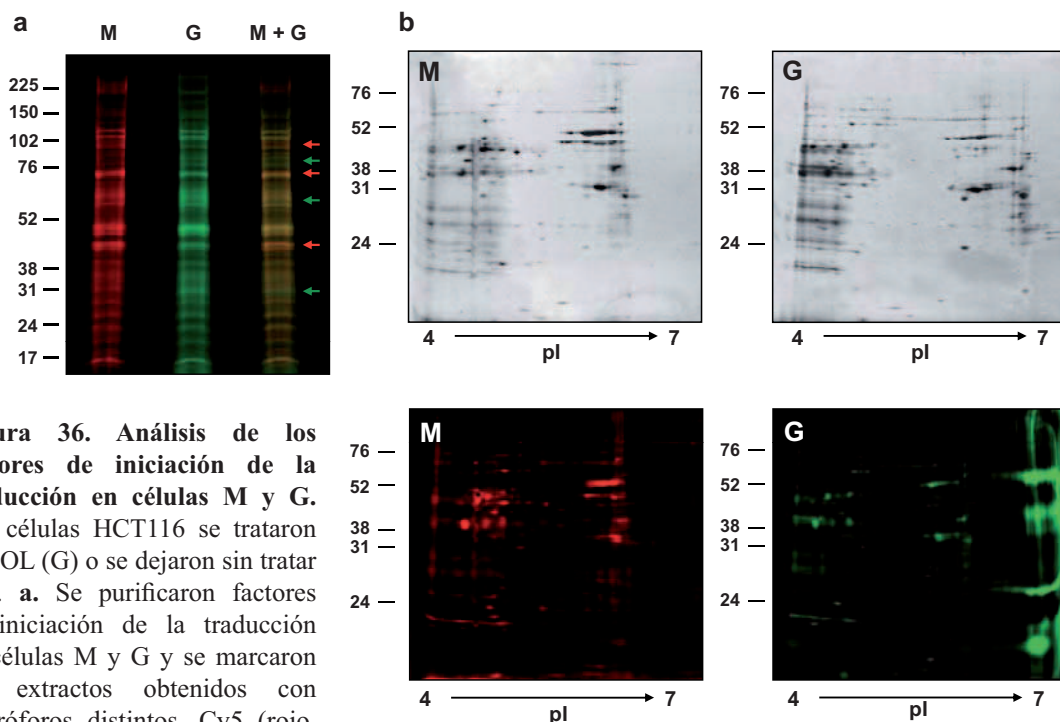
Se ha descrito que la producción de ROS promueve la inhibición de las proli-hidroxilasas (Guzy y cols., 2005; Mansfield y cols., 2005). Por lo tanto, estudiamos el papel del estrés oxidativo en la regulación de la expresión de las proteínas del metabolismo energético mediante el tratamiento de las células M con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En la figura 35 se puede observar como el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promueve una represión global de la traducción de proteínas en la célula en comparación con las células sin tratar (Fig. 35). Estudiamos la velocidad inicial de síntesis de β-F1, Hsp60 y GAPDH (Fig. 35) y observamos un patrón muy parecido al observado en las células tratadas con DMOG (Fig. 34). Las velocidades iniciales de síntesis de β-F1 y Hsp60 son significativamente menores en presencia del estrés oxidativo provocado por el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al comparar con las células control (Fig. 35). Por contra, la velocidad inicial de síntesis de GAPDH es mayor en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 35). Estos resultados ponen de manifiesto el papel de los ROS en señalar, posiblemente vía inhibición de las proli-hidroxilasas, cambios en la traducción de proteínas implicadas en el metabolismo energético que son necesarios para la adquisición del fenotipo agresivo tumoral.



**Figura 35. El estrés oxidativo dificulta la síntesis específica de proteínas mitocondriales.** Las células HCT116 se trataron con 40-50 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 48h (barras negras) o se dejaron sin tratar (barras blancas). Trás un marcaje metabólico de 40 min con <sup>35</sup>S-metionina, se determinó la velocidad inicial de síntesis *in vivo* de las proteínas β-F1, Hsp60 y GAPDH mediante inmunoprecipitación de 100 μg de proteína en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3). La proteína sintetizada se visualizó tras el fraccionamiento de los inmunoprecipitados en geles de poli-acrilamida-SDS (9%). Se determinó la incorporación de radiactividad total a proteína mediante precipitación con TCA. Los histogramas representan la media ±SEM de tres experimentos independientes normalizados por el valor de la media en las células control. pi: inmunoprecipitados con IgGs de ratón no específicas. \* p< 0.05 al comparar frente a las células control.

#### 4.2.12. Distinto perfil de factores de iniciación de la traducción entre células M y G.

Como se ha descrito anteriormente, las células M y G se diferencian en la regulación de la velocidad inicial de síntesis de proteínas mitocondriales y glucolíticas. Por ello quisimos estudiar en profundidad qué factores y mecanismos relacionados con la traducción de proteínas pudieran estar mediando esta regulación diferencial. Para ello llevamos a cabo una purificación de factores de iniciación de la traducción de los dos tipos celulares. El análisis de los factores en PAGE-SDS, marcando cada uno de los extractos purificados con un fluoróforo distinto, mostró un perfil distinto de los factores de iniciación en las células M y G (Fig. 36). En la figura 36a se muestra un gel monodimensional donde se corrieron los dos extractos marcados de forma independiente (M en rojo y G en verde). Además, en el tercer carril del gel se corrieron las dos muestras juntas y como se puede observar los dos perfiles no son exactamente coincidentes (Fig. 36a). El análisis de estos mismos extractos mediante la técnica de geles 2D también muestra un perfil diferencial de los factores de iniciación de la traducción entre ambas condiciones ya sea por tinción con plata o por marcaje con fluoróforos (Fig. 36b) o en DIGE (Fig. 37a). Estos resultados indican que existen cambios tanto en la abundancia de los factores como en posibles modificaciones covalentes de éstos entre células M y G.

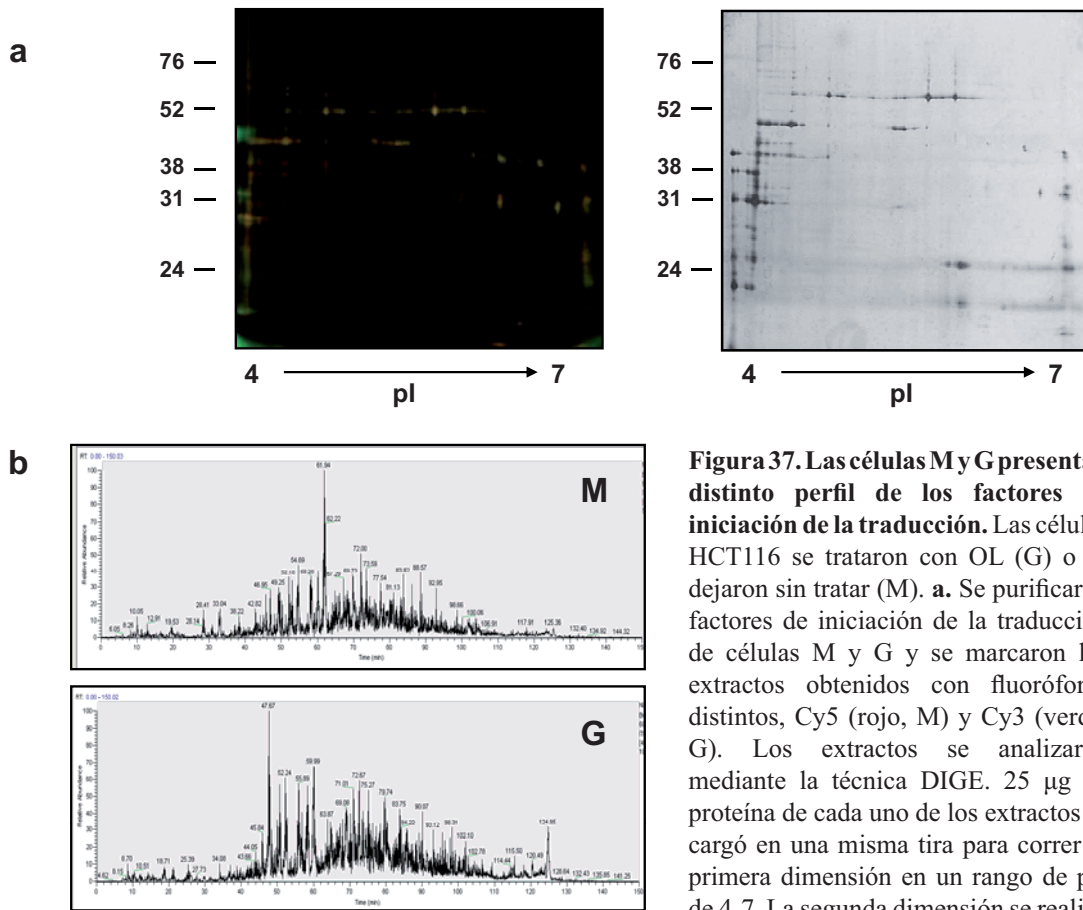


**Figura 36. Análisis de los factores de iniciación de la traducción en células M y G.**

Las células HCT116 se trataron con OL (G) o se dejaron sin tratar (M). **a.** Se purificaron factores de iniciación de la traducción de células M y G y se marcaron los extractos obtenidos con fluoróforos distintos, Cy5 (rojo, M) y Cy3 (verde, G). Se corrieron 25  $\mu$ g de proteína de extractos purificados y marcados de células M y G, y los dos juntos (M + G) en geles de poliacrilamida-SDS (9%). Posteriormente el gel se reveló usando el escáner Typhoon 9410. En el gel se puede observar como el perfil de los factores de iniciación de la traducción es distinto en células M y G (flechas verdes y rojas). **b.** El análisis de los extractos conteniendo los factores de iniciación de la traducción mediante la técnica de geles 2D confirmó que los perfiles son distintos en células M y G tanto por tinción con plata (paneles superiores) como mediante el revelado de los geles usando el escáner Typhoon 9410 (paneles inferiores). El rango de pH usado en la primera dimensión fue de 4-7 y la segunda dimensión se corrió en geles de poliacrilamida-SDS (9%).

El rango de pH usado en la primera dimensión fue de 4-7 y la segunda dimensión se corrió en geles de poliacrilamida-SDS (9%).

Se analizaron los extractos que contienen los factores de iniciación de la traducción obtenidos de células M y G por espectrometría de masas y el resultado fue que efectivamente los perfiles de masas obtenidos son muy distintos (Fig. 37b). Un análisis semicuantitativo de dos preparaciones distintas reveló que las células G tienen una menor expresión de una serie de factores de iniciación de la traducción (Tabla 7, filas en azul) que los hace presumiblemente necesarios para la traducción de proteínas mitocondriales ya que no está afectada la síntesis global de proteínas entre M y G (Fig. 17b). Por el contrario, hay otros factores cuya expresión es mayor en células G que en M (Tabla 7, filas en rojo), lo que los hace más relevantes para la traducción de mRNAs de la glucólisis. Este resultado es muy significativo ya que se pudo identificar casi el 100% de los factores de iniciación de la traducción que existen en la célula eucariota.



**Figura 37. Las células M y G presentan distinto perfil de los factores de iniciación de la traducción.** Las células HCT116 se trataron con OL (G) o se dejaron sin tratar (M). **a.** Se purificaron factores de iniciación de la traducción de células M y G y se marcaron los extractos obtenidos con fluoróforos distintos, Cy5 (rojo, M) y Cy3 (verde, G). Los extractos se analizaron mediante la técnica DIGE. 25 µg de proteína de cada uno de los extractos se cargó en una misma tira para correr la primera dimensión en un rango de pH de 4-7. La segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida-SDS (9%).

**b.** El análisis de los extractos conteniendo los factores de iniciación de la traducción de células M y G por espectrometría de masas confirmó la existencia de diferencias en el perfil de los factores de iniciación de la traducción en las dos condiciones.

Nº asignado por UniProt	MW [kDa]	calc. pI	Descripción	Símbolo	Suma G	Suma M
P47813	16,5	5,24	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	eIF1AX	0	1
O14602	16,4	5,24	Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-chromosomal	eIF1AY	0	1
Q59GZ3	10,2	4,50	Eukaryotic translation initiation factor 2 beta	eIF2S2	1	0
P05198	36,1	5,08	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	eIF2S1	4	1
P41091	51,1	8,40	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	eIF2S3	1	3
Q9BY44	64,9	8,87	Eukaryotic translation initiation factor 2A	eIF2A	0	1
B4DYS1	162,3	6,99	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	eIF3A	0	2
P55884	92,4	5,00	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	eIF3B	0	4
B4DDN4	91,6	6,74	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	eIF3C	1	2
B4E1K8	52,8	5,80	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	eIF3D	0	2
B4DMT5	33,2	5,59	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	eIF3F	1	3
O75821	35,6	6,13	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	eIF3G	0	3
Q13347	36,5	5,64	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	eIF3I	0	2
B7ZAM9	24,5	4,87	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	eIF3K	0	1
Q53HU7	36,5	5,64	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta	eIF3I	0	2
A8K5K5	35,6	6,13	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4 delta	eIF3S4	0	2
B0QY89	70,9	6,65	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E interacting protein	eIF3EIP	1	4
Q04637	175,4	5,33	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	eIF4G1	3	0
A8K088	46,1	5,48	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	eIF4A1	2	3
P23588	69,1	5,73	Eukaryotic translation initiation factor 4B	eIF4B	2	3
P06730	25,1	6,15	Eukaryotic translation initiation factor 4E	eIF4E	0	1
P55010	49,2	5,58	Eukaryotic translation initiation factor 5	eIF5	1	0
P63241	16,8	5,24	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	eIF5A	0	1
Q9GZV4	16,8	5,58	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	eIF5A2	0	1
Q8N5A0	138,7	5,47	Eukaryotic translation initiation factor 5B EIF5B	eIF5B	1	1
B7ZBG9	23,7	5,17	Eukaryotic translation initiation factor 6 EIF6	eIF6	2	1

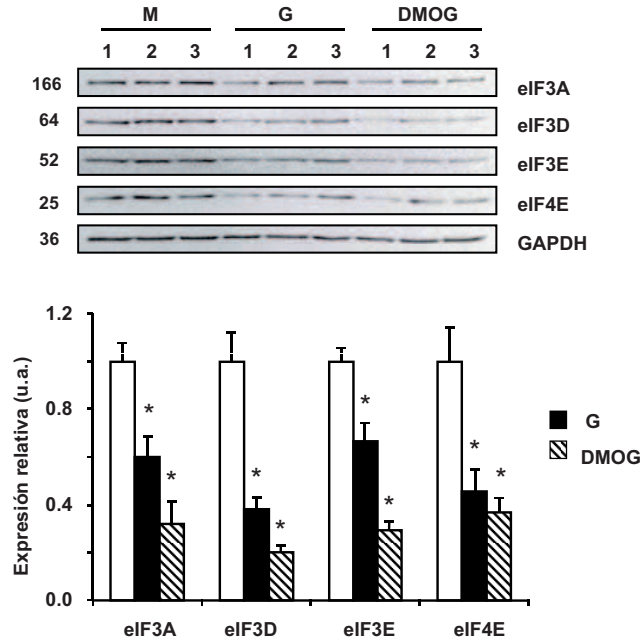
**Tabla 7. La células G presentan una menor expresión de la mayoría de los factores de iniciación de la traducción.** La tabla resume los factores de iniciación de la traducción que resultaron diferencialmente expresados en el análisis por espectrometría de masas de extractos que contienen factores de iniciación de la traducción purificados de células M y G. La tabla proporciona información acerca del número asignado por UniProt, peso molecular (MW [KDa]), punto isoeléctrico calculado (calc. pI), descripción y símbolo de cada proteína. Las últimas columnas representan las veces que están representados los distintos factores de iniciación de la traducción en células M y G. En rojo: factores más representados en células G. En azul: factores más representados en células M. Los resultados representan la suma de dos experimentos independientes.

#### 4.2.13. Los factores de iniciación eIF3D y eIF3E son necesarios para la traducción específica de proteínas mitocondriales.

Con objeto de comprobar la represión de la expresión de algunos de los factores de iniciación de la traducción por *western-blot* en las células G, seleccionamos los factores eIF3A, eIF3D y eIF4E de la tabla 7 y el factor eIF3E debido a que en las células G está más expresada la proteína que interacciona con este factor (tabla 7) y además se ha descrito previamente la implicación de los mismos en cáncer (Silvera y cols., 2010). Debido a la similitud de fenotipo entre las células G y las células tratadas con DMOG, se estudió también la expresión de estos factores en células tratadas con DMOG, comparando siempre con células M (Fig. 38). El *western blot* muestra una caída muy significativa de la expresión



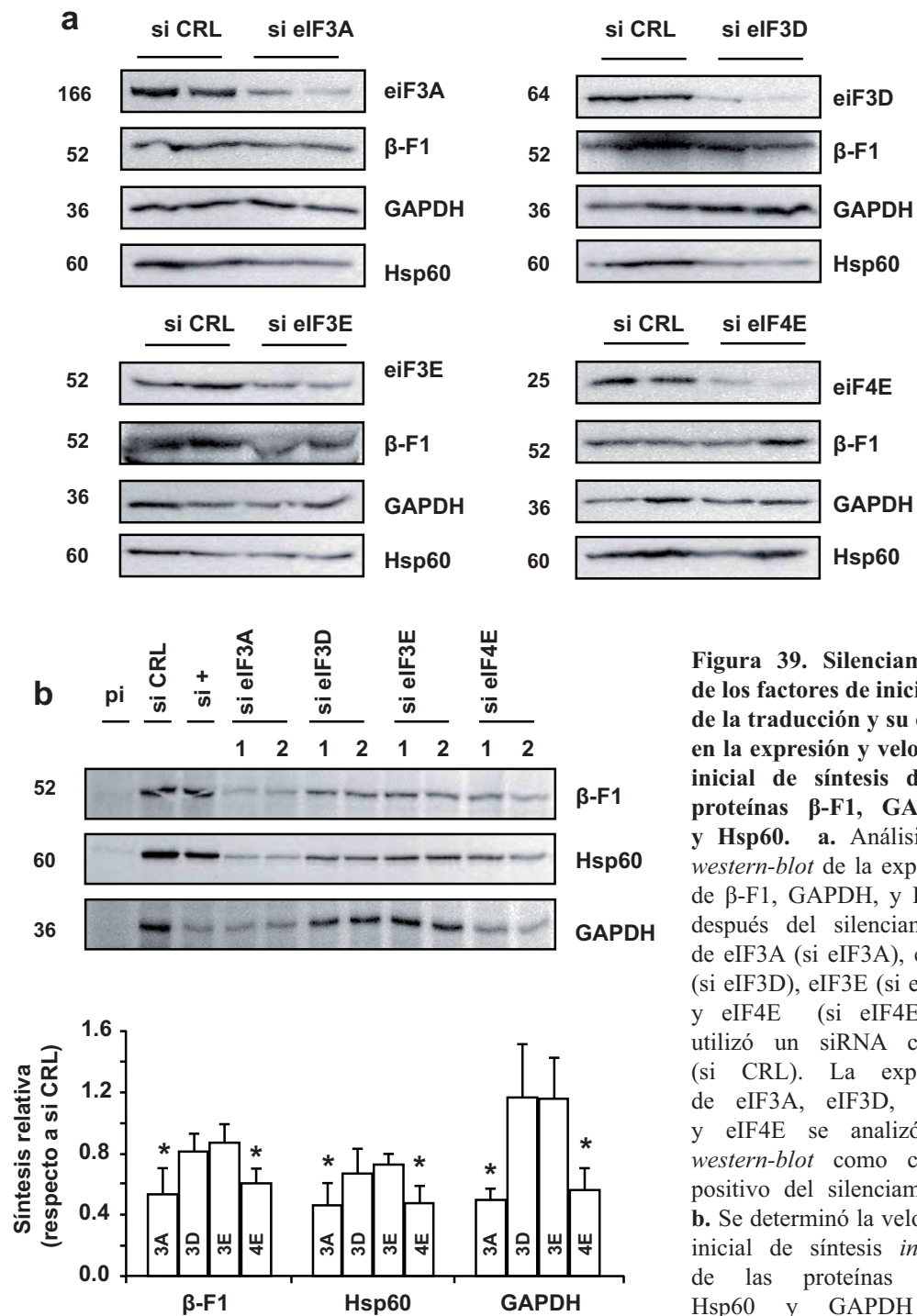
de todos los factores estudiados, eIF3A, eIF3D, eIF3E y eIF4E en células G y en células tratadas con DMOG si se comparan con las células M indicando la importancia de la actividad de las prolin-hidroxilasas para la expresión de estas proteínas de la maquinaria de traducción (Fig. 38).



**Figura 38. Confirmación por *western-blot* de la expresión de factores de iniciación de la traducción.** Análisis por *western-blot* de la expresión de los factores de iniciación de la traducción: eIF3A, eIF3D, eIF3E, eIF4E y de GAPDH en tres preparaciones diferentes (líneas 1-3) de células M, G y tratadas con DMOG. Los histogramas muestran la cuantificación de las bandas normalizadas por el valor de la media en las células M. Las barras representan la media  $\pm$ SEM de al menos tres determinaciones independientes. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a M.

Nos preguntamos entonces cuál de estos factores podría estar implicado en la regulación diferencial de proteínas mitocondriales y glucolíticas. Para ello realizamos el silenciamiento de los factores de traducción indicados (Fig. 39). En la figura 39a podemos observar un silenciamiento considerable de cada uno de los factores (~ 50-85%). Los resultados en la figura 39a indican que el silenciamiento de los factores de iniciación de la traducción no promueve cambios significativos en la expresión de las proteínas  $\beta$ -F1, Hsp60 y GAPDH en el estado estacionario.

Sin embargo, el estudio de la velocidad inicial de síntesis de las proteínas  $\beta$ -F1, Hsp60 y GAPDH indicó que el silenciamiento de los factores eIF3A y eIF4E, promueve una disminución significativa de la velocidad inicial de síntesis de todas las proteínas estudiadas (Fig. 39b). Estos datos indican la importancia de éstos factores de iniciación en el control global de la síntesis de proteínas. Por otro lado, el silenciamiento de los factores eIF3D y eIF3E tiene efecto sobre la velocidad inicial de síntesis de las proteínas mitocondriales  $\beta$ -F1 y Hsp60 sin afectar de forma significativa la velocidad inicial de síntesis de GAPDH (Fig. 39b). Estos datos sugieren que los factores de iniciación de la traducción eIF3D y eIF3E son más limitantes para una eficiente traducción de proteínas mitocondriales.

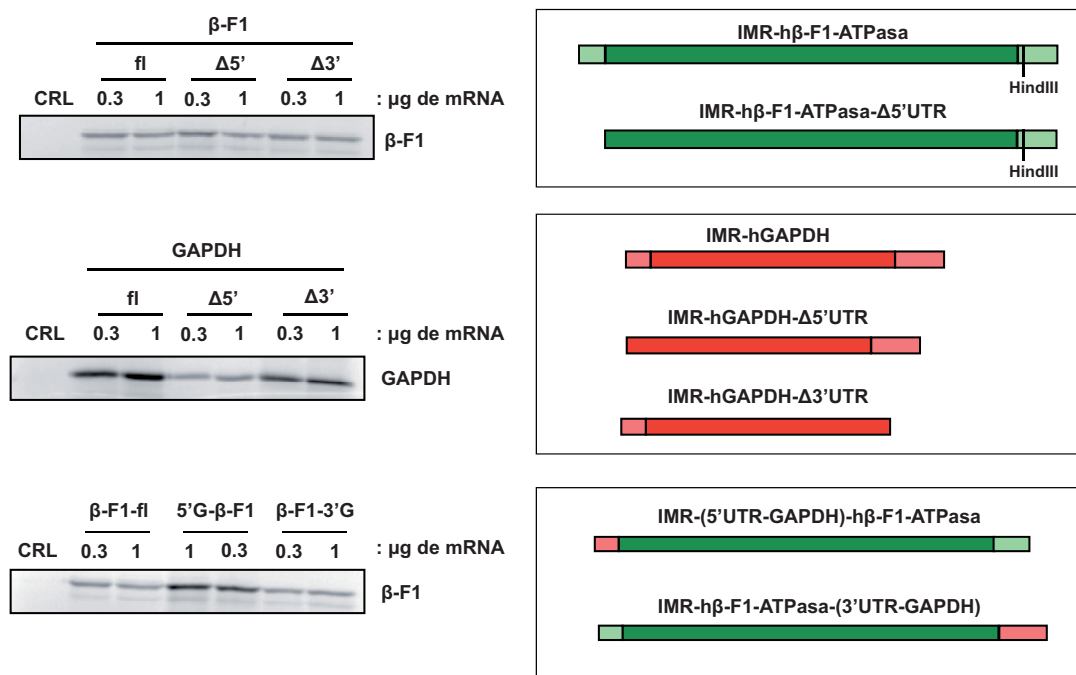


**Figura 39. Silenciamiento de los factores de iniciación de la traducción y su efecto en la expresión y velocidad inicial de síntesis de las proteínas  $\beta$ -F1, GAPDH, y Hsp60.** a. Análisis por *western-blot* de la expresión de  $\beta$ -F1, GAPDH, y Hsp60 después del silenciamiento de eiF3A (si eiF3A), eiF3D (si eiF3D), eiF3E (si eiF3E) y eiF4E (si eiF4E). Se utilizó un siRNA control (si CRL). La expresión de eiF3A, eiF3D, eiF3E y eiF4E se analizó por *western-blot* como control positivo del silenciamiento. b. Se determinó la velocidad inicial de síntesis *in vivo* de las proteínas  $\beta$ -F1, Hsp60 y GAPDH por inmunoprecipitación tras

un marcaje metabólico de 40 minutos con  $^{35}$ S-metionina después del silenciamiento de eiF3A, eiF3D, eiF3E y eiF4E (líneas 1-2) en las células. Se utilizó un siRNA control (si CRL). Se realizó el silenciamiento de GAPDH como control de silenciamiento positivo (si+). La proteína sintetizada se visualizó tras el fraccionamiento de los inmunoprecipitados en geles de poli(acrilamida)-SDS (9%). Los histogramas representan la media  $\pm$ SEM de al menos cuatro determinaciones independientes normalizadas por el valor de la media en las células control (si CRL). pi: inmunoprecipitados con IgGs de ratón no específicas. \*  $p < 0.05$  al comparar frente a las células control.

4.2.14. Ensayos de competencia en la traducción *in vitro* entre los mRNAs de  $\beta$ -F1 y de GAPDH.

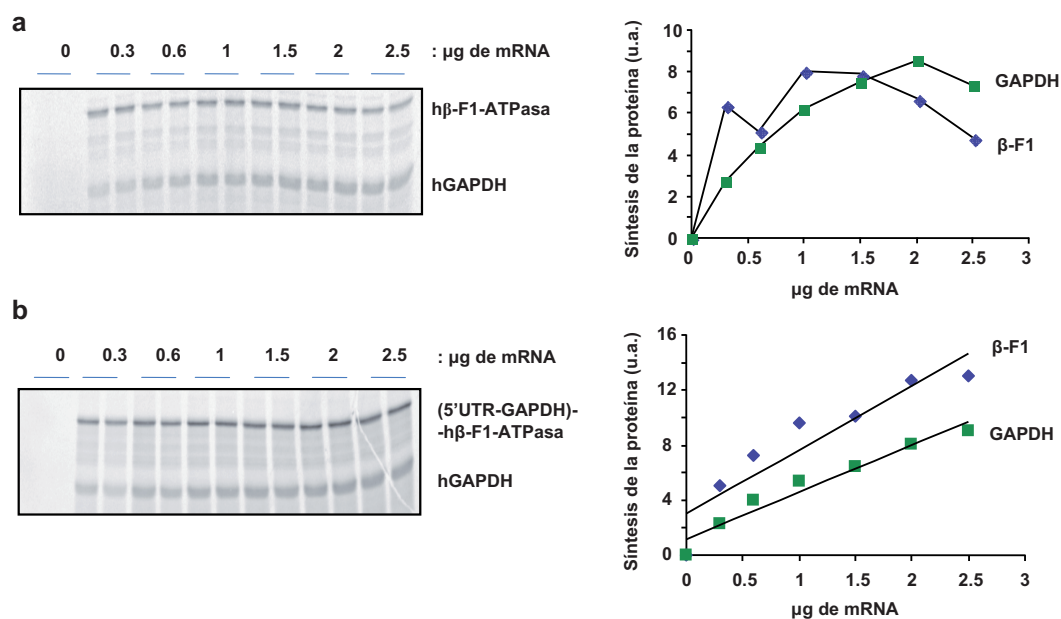
Por último quisimos estudiar los elementos reguladores en cis- de los mRNAs de  $\beta$ -F1 y GAPDH que pudieran favorecer una competencia entre los mismos en situaciones de estrés metabólico. Previamente, se ha descrito en el laboratorio la importancia del elemento 3'UTR para una traducción eficiente del mensajero de  $\beta$ -F1 en rata (Izquierdo y Cuezva, 1997; de Heredia y cols., 2000; Willers y cols., 2010; Willers y cols., 2012). Hicimos construcciones para deleccionar los 5'UTR y 3'UTR de los dos mRNAs, así como quimeras, intercambiando el 5'UTR de  $\beta$ -F1 por el 5'UTR de GAPDH en un caso y realizando el mismo intercambio pero con el 3'UTR en otro caso (Fig. 8 y Fig. 40) y estudiamos su traducción *in vitro* utilizando lisado de reticulocitos y marcando las proteínas traducidas con  $^{35}\text{S}$ -metionina (Fig. 40).



**Figura 40. El elemento 5'UTR del mRNA de GAPDH es esencial para su traducción.** Se realizaron distintas clonaciones (Fig. 8) para estudiar el papel de los elementos reguladores 5'UTR y 3'UTR de los mRNAs de  $\beta$ -F1 y GAPDH en la traducción de las proteínas. En la parte derecha de la figura se representan las clonaciones realizadas de forma esquemática. En la figura se muestra la proteína sintetizada por traducción *in vitro* en lisado de reticulocitos de los distintos mRNAs obtenidos por transcripción *in vitro*:  $\beta$ -F1-mRNA-fl,  $\beta$ -F1-mRNA- $\Delta$ 5'UTR,  $\beta$ -F1-mRNA- $\Delta$ 3'UTR, GAPDH-mRNA-fl, GAPDH-mRNA- $\Delta$ 5'UTR, GAPDH-mRNA- $\Delta$ 3'UTR, 5'UTR-GAPDH- $\beta$ -F1-mRNA y  $\beta$ -F1-mRNA-3'UTR-GAPDH. Se añadieron 0.3 y 1  $\mu\text{g}$  de cada mRNA, 1.6  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  de  $^{35}\text{S}$ -metionina e inhibidores de RNAsas, en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$ . Se corrieron 5  $\mu\text{l}$  de cada reacción en geles de poliacrilamida-SDS (9%), se secaron y se revelaron usando el escáner Typhoon 9410. Se realizó una reacción en paralelo sin mRNA añadido como control (CRL).

En nuestro caso, no observamos cambios significativos en la traducción de  $\beta$ -F1 humano *in vitro* al comparar las construcciones donde se han deleccionado el 5'UTR y el 3'UTR con el mRNA completo (Fig. 40). Sin embargo, en el caso de GAPDH, la deleción del 5'UTR promueve una caída muy significativa en la traducción del mRNA de GAPDH (Fig. 40). La deleción del 3'UTR de GAPDH también promueve una menor eficiencia en la traducción del mRNA pero no es tan evidente como en el caso del 5'UTR (Fig. 40). Estos datos sugieren que el 5'UTR de GAPDH es un elemento regulador positivo de la traducción de su mRNA. Al intercambiar el 5'UTR de  $\beta$ -F1 por el 5'UTR de GAPDH, aumenta muy significativamente la traducción del mRNA de  $\beta$ -F1 (Fig. 40). Es decir, el elemento 5'UTR del mRNA de GAPDH podría estar confiriendo una ventaja traduccional al mRNA de GAPDH frente al mRNA de  $\beta$ -F1 en situaciones de estrés celular. El intercambio del 3'UTR de  $\beta$ -F1 por el 3'UTR de GAPDH no produjo cambios significativos en la traducción del mRNA de  $\beta$ -F1 (Fig. 40).

Después de titular la cantidad necesaria de los mRNAs para tener una incorporación lineal de  $^{35}\text{S}$ -metionina, llevamos a cabo ensayos de competición de la traducción *in vitro* de los mRNAs de  $\beta$ -F1 y GAPDH (Fig. 41a). En estos ensayos pudimos ver como la traducción de  $\beta$ -mRNA es más eficiente que la del mRNA de GAPDH aunque a altas concentraciones de los mRNAs se traduce mejor el mRNA de GAPDH (Fig. 41a).

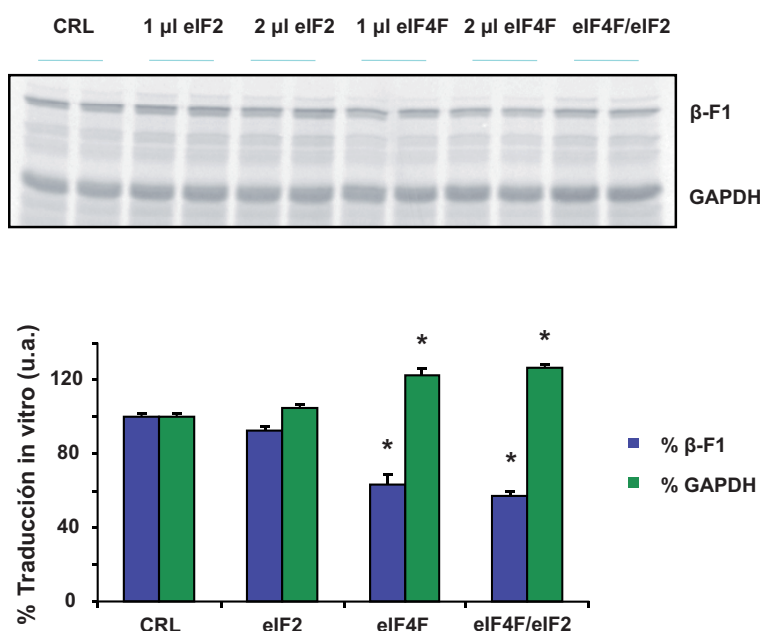


**Figura 41. Ensayo de competencia de traducción *in vitro* de los mRNAs de  $\beta$ -F1, GAPDH y la quimera (5'UTR-GAPDH)- $\beta$ -F1-mRNA. a y b.** En cada reacción de traducción *in vitro* en lisado de reticulocitos se añadieron cantidades crecientes y por igual de cada mRNA transcrito *in vitro* (de 0 a 2.5  $\mu\text{g}$  totales), 1.6  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  de  $^{35}\text{S}$ -metionina e inhibidores de RNAsas, en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$ . Se corrieron 5  $\mu\text{l}$  de cada reacción en geles de poliacrilamida-SDS (9%), se secaron y se revelaron usando el escáner Typhoon 9410. Las gráficas corresponden a la cuantificación de las bandas y representan la cantidad de proteína sintetizada en el ensayo con respecto al mRNA añadido en la reacción.

El ensayo de competencia del mRNA de GAPDH y la quimera (5'UTR-GAPDH)- $\beta$ -F1-mRNA reveló que la transferencia del 5'UTR de GAPDH sobre  $\beta$ -F1 eliminaba las diferencias en traducción a altas concentraciones de los mRNAs (Fig. 41b). En su conjunto, estos resultados demuestran la importancia del elemento regulador 5'UTR del mRNA de GAPDH.

#### 4.2.15. El 5'UTR del mRNA de GAPDH tiene más afinidad por el eIF4F.

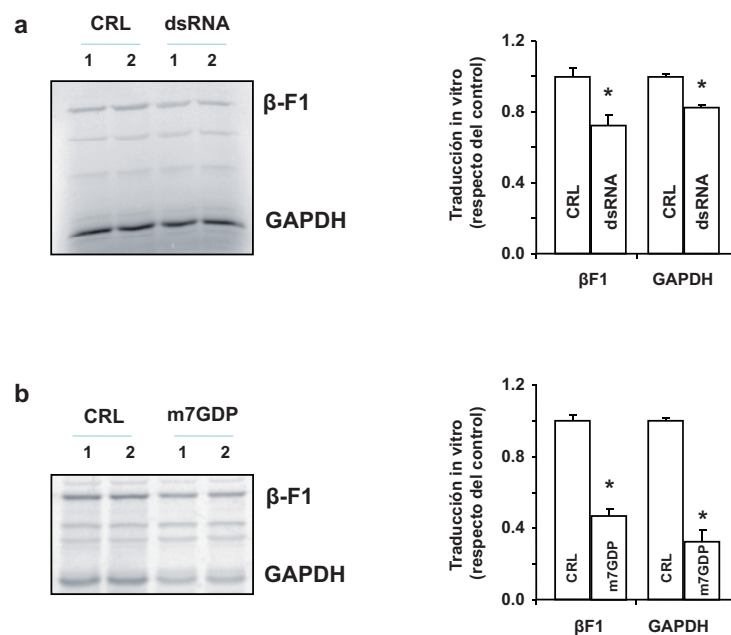
Los datos previamente descritos sugerían una mayor avidez del 5'UTR del mRNA de GAPDH por captar a los distintos factores de iniciación de la traducción. Por ello, se estudió el efecto de la adición de los factores de iniciación de la traducción eIF2 y eIF4F, que son factores clave en los primeros pasos de la iniciación de la traducción (Fig. 7). La adición del factor eIF2 en la reacción de traducción no promueve diferencias significativas en la traducción *in vitro* de los mRNAs de  $\beta$ -F1 y GAPDH ya que el porcentaje de la traducción de cada uno de los mRNAs es igual con respecto a la traducción de los dos mRNAs en ausencia de adición (Fig. 42). Sin embargo, la adición del factor eIF4F, favorece la traducción del mRNA de GAPDH frente a la del mRNA de  $\beta$ -F1, tanto de manera individual como en combinación con el factor eIF2 (Fig. 42).



**Figura 42. Análisis del efecto de los factores de iniciación de la traducción eIF2 y eIF4F en la traducción *in vitro* de los mRNAs de  $\beta$ -F1 y GAPDH.** En cada reacción de traducción *in vitro* en lisado de reticulocitos se añadieron 1.25  $\mu$ g de los mRNA de  $\beta$ -F1 y GAPDH transcritos *in vitro*, 1.6  $\mu$ Ci/ $\mu$ l de  $^{35}$ S-metionina, inhibidores de RNAsas y 1 ó 2  $\mu$ l de los factores de iniciación de la traducción eIF2 (0.9  $\mu$ g/ $\mu$ l) y eIF4F (0.74  $\mu$ g/ $\mu$ l) en un volumen final de 15  $\mu$ l. Se corrieron 5  $\mu$ l de cada reacción en geles de poliacrilamida-SDS (9%), se secaron y se revelaron posteriormente

usando el escáner Typhoon 9410. El histograma representa la media  $\pm$ SEM del porcentaje de síntesis de cada proteína con respecto al total de proteína sintetizada normalizado por el control (CRL) de cuatro determinaciones independientes. \*  $p < 0.05$  al comparar frente al control.

Consecuentemente con estos resultados, el estudio del efecto de la adición en la reacción de traducción de los inhibidores m7GDP que es un inhibidor del factor eIF4F y dsRNA que inhibe al factor eIF2, reveló que la adición de dsRNA tiene menor efecto sobre la traducción de los mRNAs de  $\beta$ -F1 y GAPDH que la adición del m7GDP (Fig. 43a y 43b). Además, el m7GDP, inhibe en mayor medida la traducción del mRNA GAPDH que el de  $\beta$ -F1 (Fig. 43a y 43b). En su conjunto estos resultados sugieren la mayor avidez del 5'UTR del mRNA por el factor eIF4F que podría estar favoreciendo su traducción en situaciones de estrés metabólico celular.



**Figura 43. Análisis del efecto de los inhibidores de los factores de iniciación de la traducción dsRNA y m7GDP en la traducción *in vitro* de los mRNAs de  $\beta$ -F1 y GAPDH.** En cada reacción de traducción *in vitro* en lisado de reticulocitos se añadieron 1.25  $\mu$ g de los mRNA de  $\beta$ -F1 y GAPDH transcritos *in vitro*, 1.6  $\mu$ Ci/ $\mu$ l de  $^{35}$ S-metionina, inhibidores de RNAsas y los inhibidores de los factores de iniciación de la traducción, dsRNA a 8.29  $\mu$ g/ $\mu$ l (eIF2) y m7GDP a 11.5  $\mu$ M (eIF4F) en un volumen final de 15  $\mu$ l. Se corrieron 5  $\mu$ l de cada reacción en geles de poliacrilamida-SDS (9%) y se secaron y se revelaron usando el escáner Typhoon 9410. El histograma representa la media  $\pm$ SEM de la síntesis de cada proteína con respecto al control (CRL) de cuatro determinaciones independientes. \*  $p < 0.05$  al comparar frente al control.



## ***DISCUSIÓN***





## **5. DISCUSIÓN**

La reprogramación metabólica ha sido finalmente aceptada como una característica fenotípica de la célula tumoral y eventualmente como una nueva diana terapéutica del cáncer (Kroemer y Pouyssegur, 2008; Hanahan y Weinberg, 2011). El cambio metabólico de la célula tumoral supone un aumento de la glucólisis aerobia y la inhibición al menos parcial de la fosforilación oxidativa. Si bien el incremento de la glucólisis está plenamente aceptado y ha sido trasladado a la clínica mediante la tomografía de emisión de positrones usando 18-fluorodesoxiglucosa (FDG-PET), la alteración del metabolismo energético mitocondrial sigue siendo objeto de un intenso debate (Dang, 2010).

En este contexto, nuestro laboratorio ha demostrado que tanto la expresión como la actividad de la  $H^+$ -ATP sintasa están alteradas en la mayoría de los carcinomas humanos. Se ha descrito que la menor expresión de  $\beta$ -F1-ATPasa en cáncer se debe a mecanismos que implican la inhibición de su traducción (Willers y Cuezva, 2011). La expresión normalizada de  $\beta$ -F1-ATPasa frente a la expresión de la enzima glucolítica GAPDH define la *huella bioenergética* del cáncer que ofrece un marcador pronóstico de la enfermedad en diversos tipos de carcinomas (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005; Lopez-Rios y cols., 2007; Lin y cols., 2008; Ortega y cols., 2008; Aldea y cols., 2011). Además, es una buena herramienta en la predicción de la respuesta a quimioterapia (Shin y cols., 2005; Santamaria y cols., 2006; Lin y cols., 2008; Sanchez-Arago y Cuezva, 2011). Más recientemente, hemos descrito la sobre-expresión de IF1 en carcinomas de mama, colon y pulmón, lo que reprime la actividad de la  $H^+$ -ATP sintasa y promueve el cambio metabólico necesario para la progresión tumoral (Sanchez-Cenizo y cols., 2010), además de promover la señalización intracelular mediada por ROS implicada en proliferación y resistencia a muerte (Formentini y cols., 2012).

A pesar de que esté aceptado que la mitocondria tiene un papel en cáncer, se desconocen en profundidad los mecanismos que median la desregulación de la expresión de  $\beta$ -F1-ATPasa y que dificultan la fosforilación oxidativa en cáncer de colon. Por este motivo, el objetivo de esta tesis ha sido la caracterización de los mecanismos y vías de señalización implicados en la reprogramación metabólica necesaria para la progresión del carcinoma colorrectal.

Los resultados de esta tesis confirman que el tratamiento de las células HCT116 con oligomicina tiene un profundo impacto sobre la estructura y función de la mitocondria promoviendo un aumento en el flujo glucolítico, que se acompaña de una disminución de la fosforilación oxidativa (Fig. 10). Lógicamente, estos cambios en el fenotipo celular están mediados por la activación/represión de los factores de transcripción que regulan el metabolismo energético y la biogénesis de la mitocondria. La biogénesis mitocondrial es un proceso complejo que requiere la participación de varios factores de transcripción (FTs) y está regulada de manera tejido específico (Scarpulla, 2008). Los activadores

transcripcionales NRF-1, NRF-2, SP1, YY1, CEBP y CREB entre otros, y los co-activadores nucleares PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  y PRC-1 participan activamente en las vías que gobiernan la biogénesis y función mitocondrial (Puigserver, 2005; Spiegelman, 2007; Scarpulla, 2008). De la actividad de estas moléculas dependen procesos tan importantes como la síntesis de proteínas mitocondriales y la activación o represión de otros factores de transcripción necesarios para garantizar la expresión coordinada del genoma mitocondrial durante la biogénesis del orgánulo (Scarpulla, 2008). El análisis de la actividad de los FTs no ha encontrado diferencias significativas en YY1 y CREB (datos no mostrados) cuya activación está descrita para la biogénesis mitocondrial en músculo (Scarpulla, 2002). Sin embargo, se apreciaron aumentos en la actividad de los factores FAST1, p53, SP1, OCT, STAT3, TR y MEF2 así como una disminución de AP2 y CEBP en las células G (Fig. 11). Por tanto, estos resultados parecen sugerir que la represión de la biogénesis mitocondrial en las células de carcinoma colorrectal (Sanchez-Arago y cols., 2010) se ejerce por la participación combinada de estos FTs.

Debemos destacar que estos factores de transcripción desempeñan funciones reguladoras en procesos tan importantes como el desarrollo, la apoptosis, el control del ciclo celular y el metabolismo (Roberts y cols., 1991; Hilger-Eversheim y cols., 2000; Wang y cols., 2001; Yen, 2001; Potthoff y Olson, 2007). En concreto, se ha descrito que el factor de transcripción CEBP desempeña un papel crucial en la biogénesis mitocondrial en tejido adiposo (Carmona y cols., 2002; Chiu y cols., 2004). La caída en la expresión de este factor en las células G sugiere su participación en la represión de la biogénesis mitocondrial en carcinoma de colon (Sanchez-Arago y cols., 2010). Una de las funciones más características de AP2 es la inhibición del ciclo celular mediante la activación de la expresión de p21 (Zeng y cols., 1997). En este sentido, la menor actividad de AP2 en las células G concuerda con el aumento de la fosforilación de Rb, la mayor capacidad proliferativa de estas células (Fig. 14) y su mayor carácter agresivo (Sanchez-Arago y cols., 2010) posiblemente porque no tienen arresto de ciclo. Además, la mayor proliferación en las células G concuerda con el mayor flujo glucolítico que tienen éstas ya que la glucólisis es la vía que se activa en proliferación. En efecto, está demostrado que la glucólisis es la vía más activa en las fases S y G2/M del ciclo celular que son las fases reductivas del ciclo metabólico (Brand y Hermfisse, 1997; Tu y McKnight, 2006; Cuezva y cols., 2009) y donde se sintetizan la mayoría de los componentes mitocondriales (Martinez-Diez y cols., 2006). La activación de la glucólisis e inhibición de la OXPHOS en estas fases del ciclo (Brand y Hermfisse, 1997; Tu y McKnight, 2006; Cuezva y cols., 2009) evita el daño oxidativo al DNA que pueden provocar los ROS generados en la fosforilación oxidativa. La activación de la glucólisis tiene como objeto tener una mayor disponibilidad de precursores metabólicos así como de poder reductor para la síntesis de macromoléculas (Formentini y cols., 2010). Además, la producción de lactato parece favorecer la metástasis y ausencia de respuesta inmunológica contra la célula tumoral (Hirschhaeuser y cols., 2011). Así mismo,

la acidificación del medio parece promover la activación de AMPK que a su vez aumenta la expresión de PFKFB incrementando así el flujo glucolítico (Mendoza y cols., 2012). Por otro lado, los tumores se encuentran en ambientes con bajos niveles de oxígeno en los que la activación de una vía de producción de energía que sea eficiente en ausencia del mismo resulta muy beneficiosa para la célula (Bailey y cols., 2012).

Recientemente, la pérdida de función del factor de transcripción OCT1 se ha relacionado con el cambio metabólico que subyace al proceso de tumorigénesis (Shakya y cols., 2009). El aumento de la actividad de OCT1 en células G es plenamente coincidente con la activación de la glucólisis aerobia y el cambio metabólico necesario para la progresión tumoral. Por el contrario, resulta sorprendente que las células G tengan mayor actividad de STAT3 y MEF2, ya que se ha descrito que la actividad de éstos FTs es necesaria para la biogénesis y actividad de la mitocondria (Naya y cols., 2002; Wegrzyn y cols., 2009). Así mismo, se ha relacionado al gen supresor de tumores p53 con la regulación del metabolismo en cáncer (Bensaad y cols., 2006; Matoba y cols., 2006). La pérdida de función de p53 promueve la represión de la respiración mitocondrial y el cambio metabólico hacia una mayor glucólisis aerobia (Matoba y cols., 2006). Por ello, la activación de estos factores de transcripción en las células G podría estar indicando la activación de vías de señalización dirigidas a restaurar el estado bioenergético de la célula ante una situación de estrés metabólico.

Además, lo que es más importante, muchas de las proteínas diana que son susceptibles de regulación por estos factores de transcripción, resultaron diferencialmente expresadas entre los dos fenotipos celulares en el estudio del transcriptoma que hemos realizado mediante la tecnología Affimetrix (Tabla 5, Anexo I) (Sanchez-Arago y cols., 2010). Estos datos confirman la participación de estos factores en la reprogramación fenotípica de las células G. El análisis de las funciones e interacciones de las proteínas diana reveló que muchas de ellas están relacionadas con vías de señalización implicadas en cáncer para promover la represión de la función bioenergética de la mitocondria, lo cual confiere una gran validez a nuestro sistema experimental (Tabla 6). Así, entre las proteínas diana nos encontramos con algunas que tienen un destacado e importante papel en las vías de señalización que median la tumorigénesis por su implicación en procesos de adhesión, crecimiento, migración, diferenciación y muerte celular, como son EGFR, VEGFA y Bcl-xl que tienen muy aumentada su expresión en las células G (Fig. 12). En concreto, se verificó la mayor expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xl en células G a nivel proteico (Fig. 15). Así mismo, el aumento en la forma total de la quinasa ERK 1/2 y la disminución de su forma fosforilada en las células G sugiere la inhibición de esta vía de señalización contribuyendo así a prevenir la inducción de muerte celular por apoptosis en el fenotipo agresivo (Wang y cols., 2000; Tang y cols., 2002).

El estudio del ciclo celular mostró una mayor muerte celular en las células G que en las M (Fig. 15). Si bien, constituye una pequeña proporción de células lo que sugiere que no

todas las células serían capaces de reprogramar las vías metabólicas para adquirir el fenotipo agresivo compatible con la progresión tumoral. El estrés bioenergético inducido por el tratamiento con oligomicina se manifiesta en un aumento de ROS y del estrés oxidativo de las proteínas en células G (Fig. 13). Esta observación sugiere que los ROS pueden estar implicados en la señalización de las rutas que promueven tanto la proliferación como la resistencia a muerte celular (Sanchez-Arago y cols., 2010; Sanchez-Arago y Cuezva, 2011). De forma congruente con la represión de la bioenergética mitocondrial observada en células G (Sanchez-Arago y cols., 2010), el origen de estas especies reactivas de oxígeno se imputa a una producción citoplasmática ya que no son detectados con MitoSox, son apantallados por NAC y no por mitoQ (Fig. 13).

Los ROS están implicados en muchas vías de señalización. Además, se sabe que los efectos que pueden tener los ROS en la respuesta celular dependen tanto de los niveles (Hamanaka y Chandel, 2010) como del lugar donde se producen (Finkel, 2011). Por ejemplo, los ROS mitocondriales señalizan vías de comunicación retrogradadas hacia el núcleo de las células para influir en las respuestas adaptativas de las mismas (Butow y Avadhani, 2004). Además, los ROS interaccionan con diversas vías metabólicas siendo el factor de transcripción NFκB un regulador crucial de las respuestas celulares relacionadas con la supervivencia (Morgan y Liu, 2011). En este sentido, hemos descrito recientemente que la sobre-expresión de IF1 en tumores humanos desencadena una respuesta mediada por ROS que activa la vía canónica de NFκB para promover proliferación, invasión y supervivencia en células de cáncer de colon (Formentini y cols., 2012).

Sin embargo, los resultados de este trabajo muestran que los ROS producidos por el estrés metabólico en células G son de origen citoplasmático (Fig. 13). La mayor producción de ROS citoplasmáticos y el aumento de la oxidación de proteínas en células G se debe imputar a que el sistema antioxidante de estas células no es suficiente para apantallarlos. De hecho, se aprecia una disminución de la razón NAD<sup>+</sup>/NADH y un aumento de la cantidad celular de catalasa que sugieren una respuesta adaptativa para contrarrestar el estrés oxidativo. Sin embargo, hay que poner de manifiesto que los ROS producidos en estas condiciones no son deletéreos para las células, sino todo lo contrario, ya que éstas tienen una mayor capacidad de proliferación *in vivo* (Sanchez-Arago y cols., 2010) e *in vitro* (Fig. 14). En definitiva, estos resultados implican la participación de ROS citoplasmáticos en la respuesta celular ante el estrés bioenergético impuesto en las células G.

En su conjunto, estos resultados aportan evidencias moleculares que explican el fenotipo agresivo de las células G cuando se implantaron en ratones inmunodeprimidos (Sanchez-Arago y cols., 2010). Además, el análisis molecular de los tumores derivados de implantar células M y G en ratones (Sanchez-Arago y cols., 2010) reveló que éstos sufren un proceso de selección al tipo G para que el tumor pueda progresar. Los resultados en este trabajo ponen de manifiesto la relevancia del fenotipo bioenergético en el control de las rutas que promueven supervivencia y muerte celular (Sanchez-Arago y cols., 2012).

Por todos los resultados mostrados, consideramos que las células G constituyen un buen modelo para el análisis de los mecanismos y vías de señalización que median la adquisición del fenotipo metabólico compatible con la progresión tumoral (Hao y cols., 2010; Sanchez-Arago y cols., 2010).

Análisis comparativos del transcriptoma de células M y G indicaron una represión del 80% de los genes implicados en la función metabólica y bioenergética de la mitocondria en las células G (Sanchez-Arago y cols., 2010). Efectivamente, los resultados muestran que las células G tienen reprimida la expresión de todas las proteínas con actividad enzimática de la mitocondria estudiadas (PDH-E1 $\alpha$ , SDH-A, COXI, COXIV,  $\alpha$ F1 y  $\beta$ -F1) (Fig. 16) en ausencia de cambios significativos en el contenido de proteína estructural de la mitocondria (Hsp60) y del contenido celular de mtDNA (Fig. 16). Es decir, el estrés metabólico inducido por oligomicina promueve la represión bioenergética y metabólica de la mitocondria. Desde el punto de vista mecanístico hemos demostrado que la represión de la diferenciación del orgánulo está mediada por el control de la traducción de  $\beta$ -mRNA, un control que posiblemente también afecta a Hsp60 y otras proteínas mitocondriales ya sean de origen nuclear o mitocondrial. Sin embargo, no se puede descartar la participación del control transcripcional de genes mitocondriales por la evidencia de la represión de estos mRNAs en el análisis del transcriptoma (Sanchez-Arago y cols., 2010). En este sentido, es de destacar la represión de la expresión de las t-RNA sintetasas de la mitocondria, caso contrario de lo que ocurre con sus homólogos del citoplasma (Fig. 18). Además, los resultados demuestran la relevancia del control metabólico del flujo de la glucólisis (Formentini y cols., 2010) ya que ésta se activa (Fig. 10) en ausencia de cambios significativos en la expresión de enzimas clave de la vía (Fig. 16).

Este cambio fenotípico de represión de la traducción de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo ocurre en ausencia de cambios significativos en la velocidad inicial de la síntesis de proteínas de la vía glucolítica. Estos resultados ponen de manifiesto por vez primera la regulación diferencial de los mecanismos que controlan el metabolismo energético de la célula. En otras palabras, la regulación específica de la traducción de un grupo particular de mRNAs del metabolismo energético mitocondrial sería independiente de la regulación de mRNAs relacionados con la vía glucolítica. Esta regulación diferencial podría estar gobernada por la acción de un factor de traducción que sería imprescindible para la traducción de los mRNAs que codifican proteínas mitocondriales.

La represión de la expresión de  $\beta$ -F1-ATPasa que se observa en las células G es consecuencia de un enmascaramiento de la traducción de su mRNA (Fig. 17). Estos datos vuelven a poner de manifiesto la importancia del control de la traducción de este mRNA para definir la función bioenergética de la célula ya que resultados previos del laboratorio han demostrado que la expresión de  $\beta$ -F1-ATPasa en desarrollo de hígado de mamíferos (Izquierdo y cols., 1995; Izquierdo y Cuezva, 1997), durante la progresión del ciclo celular (Martinez-Diez y cols., 2006) y en carcinoma de rata (de Heredia y cols., 2000) y humano

(Willers y cols., 2010) está regulada por control de la traducción.

El enmascaramiento de la traducción del  $\beta$ -mRNA en desarrollo y cáncer está mediado por proteínas de unión al RNA (RNABPs) (Izquierdo y Cuezva, 1997; Ortega y cols., 2010) y miRNAs (Willers y cols., 2012) que interactúan con el 3'UTR del mRNA y dificultan la traducción eficiente del mismo (Willers y Cuezva, 2011). En este sentido, se ha demostrado que la unión de proteínas a  $\beta$ -mRNA depende del estado energético y redox de la célula (Izquierdo y Cuezva, 2005). En una primera etapa, podríamos imputar el silenciamiento rápido de  $\beta$ -mRNA al aumento de la razón AMP/ATP observada a corto plazo después del tratamiento con OL (Fig. 19), que estaría favoreciendo la unión de proteínas represoras de la traducción al transcrito de  $\beta$ -F1-ATPasa. Sin embargo, y de acuerdo con resultados recientes (Hao y cols., 2010), observamos que la activación de la glucólisis en respuesta al tratamiento con OL restaura los niveles de ATP en la célula a largo plazo. Es posible que en una segunda etapa, la represión de la traducción de  $\beta$ -mRNA se deba a cambios en el estado redox de las proteínas de unión a  $\beta$ -mRNA como sugiere la disminución de la razón NAD<sup>+</sup>/NADH en las células G.

El aumento de la razón AMP/ATP media la activación de AMPK y ésta se ha relacionado a su vez con la actividad de algunas RNABPs tales como HuR (Wang y cols., 2002). HuR es una proteína importante en el contexto celular ya que está implicada en la regulación post-transcripcional de la expresión génica (Srikantan y Gorospe, 2012). Un estudio del laboratorio demostró que HuR interactúa con el 3'UTR de  $\beta$ -mRNA (Ortega y cols., 2008) aunque aparentemente no tiene efectos sobre la regulación de la síntesis de la proteína (Ortega y cols., 2008). Por contra, nuestro laboratorio ha demostrado que G3BP1, una proteína que se sobre-expresa en diferentes tumores (Guitard y cols., 2001; Barnes y cols., 2002; Zhang y cols., 2007), interactúa *in vivo* con el 3'UTR de  $\beta$ -mRNA e inhibe su traducción (Ortega y cols., 2010). La actividad de G3BP1 está regulada por control post-traducciona, (Gallouzi y cols., 1998; Tourriere y cols., 2001; Tourriere y cols., 2003; Irvine y cols., 2004), así que el estado redox alterado de las células G podría tener como consecuencia modificaciones covalentes en G3BP1 o en otras RNABPs que en última instancia estarían impidiendo la traducción eficiente de  $\beta$ -F1-ATPasa y eventualmente de otras proteínas mitocondriales. No podemos olvidar que el control de la expresión génica de proteínas mitocondriales también implica la regulación post-transcripcional a nivel de la localización de los mRNAs. Sabemos a este respecto que en hepatocitos de rata, el  $\beta$ -mRNA está presente en complejos ribonucleoproteicos (Egea y cols., 1997; Ricart y cols., 1997), cuyo ensamblaje y localización subcelular depende de elementos reguladores *cis* situados en el 3'UTR y en el ORF y de la interacción de proteínas que se unen a los distintos elementos del mRNA (Ricart y cols., 2002). Como el conjunto de RNABPs que interactúan con  $\beta$ -mRNA es muy amplio (Izquierdo y Cuezva, 1997; Ortega y cols., 2010), sugerimos que el control de su traducción mediado por proteínas es muy complejo y está pendiente de un análisis más exhaustivo.

Recientemente, hemos descrito la relevancia del miRNA-127-5p en la regulación de la traducción de  $\beta$ -mRNA en el desarrollo del hígado fetal (Willers y cols., 2012). Este miRNA reprime la traducción de  $\beta$ -mRNA mediante su unión a la región 3'UTR del transcrito (Willers y cols., 2012). Debemos destacar que miRNA-127-5p no se expresa en células cancerígenas lo que pone de manifiesto la primera diferencia clara en mecanismos reguladores de la diferenciación mitocondrial entre desarrollo y cáncer. Sin embargo, no podemos excluir la presencia de otros miRNAs que estén ejerciendo funciones represoras en la traducción de las proteínas mitocondriales en nuestro contexto celular. En su conjunto, estos resultados muestran por primera vez que los mecanismos que controlan la expresión de las proteínas de las dos vías principales del metabolismo energético (fosforilación oxidativa y glucólisis) se ejercen independientemente y a distintos niveles de regulación de la expresión génica.

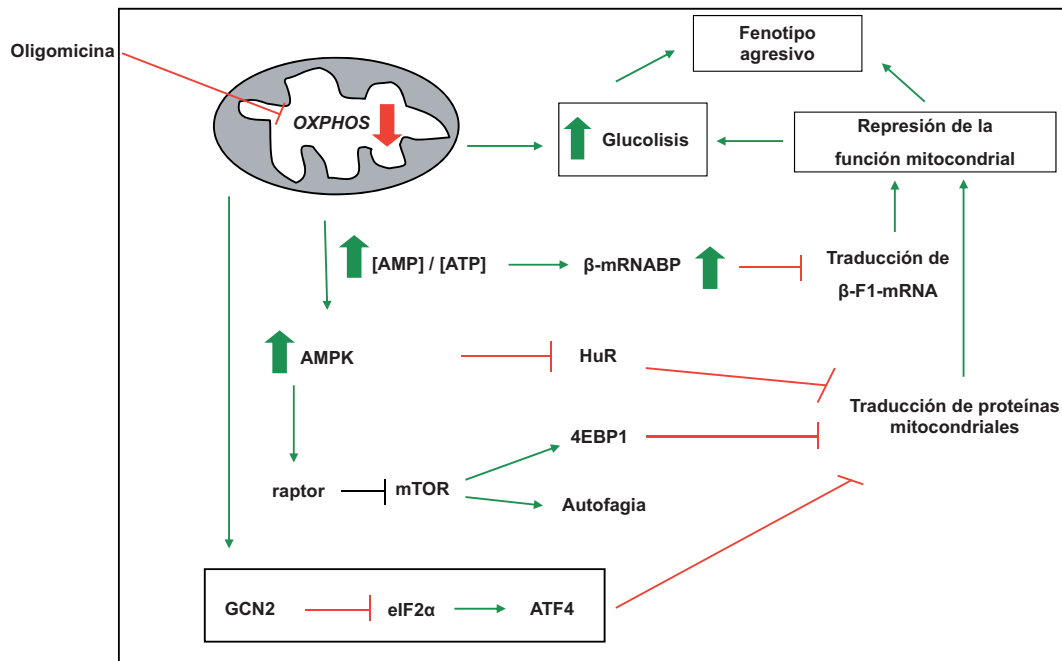
AMPK se activa en situaciones de estrés celular, cuando hay déficit de glucosa, situaciones de hipoxia o estrés bioenergético (Kahn y cols., 2005). La activación de AMPK desencadena cambios importantes en la expresión de proteínas diana que tienen una relevancia funcional muy amplia en la adaptación celular al estrés, incluyendo la regulación de la biogénesis y función mitocondrial (Schieke y cols., 2006; Jeninga y cols., 2010), autofagia (Sarbasov y cols., 2005) y angiogenesis (Ouchi y cols., 2005). Es posible que la activación persistente de AMPK que se observa en las células G después de 48h de tratamiento con OL se esté mediando por reguladores adicionales del estrés bioenergético celular ya que no se aprecian diferencias significativas en la razón AMP/ATP. Consecuentemente con la activación de AMPK en las células G, éstas presentan una mayor fosforilación de raptor, una inhibición significativa en la expresión de mTOR y la subsiguiente inhibición de la síntesis de proteínas mitocondriales y la activación de la autofagia (Fig. 44). La formación de autofagosomas y el descenso del marcador de autofagia p62 que se observa en las células G, confirman que la activación de la vía de la autofagia supone una estrategia adicional para eliminar las proteínas dañadas producidas durante la adaptación al estrés para optimizar el gasto de energía y garantizar la supervivencia celular (Sarbasov y cols., 2005).

GCN2 es una quinasa de estrés que se activa cuando hay déficit de nutrientes e infección viral (Berlanga y cols., 1999; Berlanga y cols., 2006). GCN2 reprime la traducción de la mayoría de los mRNAs, pero incrementa específicamente la traducción de ATF4 (Ye y cols., 2010). Consistentemente con la activación de GCN2, mostramos que el contenido de ATF4 está significativamente aumentado en las células G (Fig. 20). Aunque está descrito que GCN2 reprime la traducción vía fosforilación de eIF2 $\alpha$ , en nuestro estudio el contenido de la forma total y la forma fosforilada de eIF2 $\alpha$  es menor en las células G que en las M (Fig. 21a). Sin embargo, este hecho no es sorprendente ya que mantener a eIF2 $\alpha$  en estado de hipofosforilación favorece la proliferación celular y evita la inducción de muerte celular por apoptosis (Mounir y cols., 2009). Estos datos sugieren que una activación a largo plazo de GCN2 conduce a una inhibición de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  para favorecer



la progresión del tumor.

Ninguno de los mecanismos de estrés descritos que activan a AMPK y GCN2 (déficit de glucosa, hipoxia o déficit de aminoácidos) opera en nuestro modelo. Por este motivo, podemos sugerir que un producto del metabolismo, como pueden ser los ROS, podrían estar actuando como molécula señalizadora para mantener el estrés celular y la activación persistente de AMPK (Yun y cols., 2005) y GCN2. Este escenario, donde pequeñas moléculas definen el estado energético celular, ofrece hipótesis atractivas para explicar el fenotipo mitocondrial y su adaptación a corto plazo ante cambios en las condiciones metabólicas de la célula.



**Figura 44. Representación esquemática de las vías de señalización implicadas en la adquisición del fenotipo agresivo en cáncer de colon.** La inhibición de la fosforilación oxidativa mediante el tratamiento con oligomicina promueve un estrés bioenergético que resulta en cambios en la razón AMP/ATP a corto plazo y en el flujo glucolítico de las células. Además, el tratamiento con OL promueve la activación persistente de AMPK y GCN2. La activación de AMPK media la fosforilación de raptor y reprime la expresión de mTOR y HuR. Consecuentemente, aumenta la expresión de 4EBP1 y se induce la vía de la autofagia. La activación de GCN2 coopera con AMPK en la desregulación de la traducción cap-dependiente mediante la acción de eIF2α. En conjunto, estos cambios afectan tanto a corto como a largo plazo a la síntesis de proteínas mitocondriales, especialmente a la traducción de β-F1-ATPasa. Como consecuencia de esto, se reprime la actividad mitocondrial y aumenta el flujo glucolítico de las células. De esta manera se adquiere el fenotipo agresivo compatible con la progresión tumoral en células de carcinoma colorrectal.

Los cambios en la actividad de AMPK y GCN2 promueven un cambio profundo en el metabolismo energético celular hacia una glucolisis más activa debido a una disminución en la actividad de la fosforilación oxidativa (Fig. 44). Es muy posible que la activación coordinada de AMPK y GCN2 medien la represión de la traducción de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo mediante la acción de 4EBP1 y eIF2α respectivamente. Nuestros resultados muestran que AMPK y GCN2 actúan de manera

independiente ya que el silenciamiento de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de AMPK no tiene ningún efecto en el estado de fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  (Fig. 21b). En este sentido, las proteínas mitocondriales serían *in vivo* más dependientes de la traducción cap-dependiente, mientras que las enzimas glucolíticas lo serían menos, ya que su síntesis no se ve tan afectada por la interferencia con esta vía de traducción (Fig. 17 y 27). Este hecho sugiere la existencia de una vía específica para la traducción de los mRNAs implicados en la glucólisis que sería esencial debido a la importancia de esta vía para la supervivencia de la célula. Es posible que la traducción de los mRNAs de enzimas glucolíticas compartan vías de señalización y mecanismos que regulan la traducción de mRNAs implicados en la adaptación celular a condiciones de estrés (Harding y cols., 2000). En este sentido, se ha descrito que ciertos mRNAs que responden a situaciones de estrés, proangiogénesis y supervivencia como son HIF1 $\alpha$ , VEGFA o Bcl-2, cuentan con un mecanismo IRES-dependiente para su traducción (Holcik, 2004).

La represión de la función bioenergética de la mitocondria, que es un fenotipo reversible de la célula cancerosa (Sanchez-Arago y cols., 2010), se orquesta por la activación de los sensores de estrés AMPK y GCN2 (Fig. 44). De acuerdo con estos resultados, se ha descrito recientemente la activación de AMPK en carcinomas de colon (Baba y cols., 2010) y de ovario (Buckendahl y cols., 2011) y la necesidad de la vía GCN2-ATF4 para el mantenimiento de la homeostasis y supervivencia de las células tumorales (Ye y cols., 2010). La activación de AMPK se relaciona con un incremento en la biogénesis mitocondrial en músculo y en células endoteliales mediante la regulación transcripcional gobernada por la vía PGC1 $\alpha$ /NRF/Tfam (Scarpulla, 2008; Jenjina y cols., 2010). Sin embargo, no observamos cambios en la expresión de PGC1 $\alpha$  en las células G lo que indicaría que en este caso los mecanismos que median la represión de la biogénesis mitocondrial no están implicados en la adquisición del fenotipo tumoral (Sanchez-Arago y cols., 2010). Lo que indican nuestros resultados es que la activación persistente de AMPK en las células G promueve la represión de la diferenciación bioenergética de la mitocondria mediante mecanismos que controlan la traducción de proteínas. Esta represión está mediada probablemente por la acción de 4EBP1 para los transcritos codificados en genes nucleares mientras que la expresión disminuida de las aminoacil-tRNA sintetasas mitocondriales explicaría la menor traducción de los transcritos codificados en el DNA mitocondrial.

Se ha descrito que la activación de AMPK y la inhibición de mTOR son citotóxicos para las células cancerosas (Silvera y cols., 2010; van Veelen y cols., 2011). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la activación persistente de AMPK y la inhibición parcial de mTOR son necesarias para establecer el fenotipo de progresión tumoral en células de cáncer de colon mediante la represión de la función bioenergética de la mitocondria (Sanchez-Arago y cols., 2010). En este sentido, y consistentemente con nuestras observaciones, se ha descrito que la inhibición de la vía de mTOR desregula el consumo de oxígeno de la mitocondria y la capacidad de síntesis de ATP (Schieke y cols., 2006). De acuerdo con esto,

mostramos que el tratamiento con AICAR (Fig. 22, 23) o la sobre-expresión del mutante constitutivamente activo de AMPK (Fig. 22), resultan en la disminución de la capacidad de síntesis de ATP y en la inhibición de la síntesis de  $\beta$ -F1-ATPasa. Estos resultados apoyan que la actividad de la vía de mTOR es esencial para el mantenimiento de la función bioenergética de la mitocondria (Schieke y cols., 2006) y específicamente para la síntesis de  $\beta$ -F1-ATPasa. De acuerdo con nuestros resultados, se ha descrito que la inhibición de AMPK incrementa la sensibilidad de la respuesta celular al tratamiento con quimioterapia (Kim y cols., 2008; Jin y cols., 2012). Además, AMPK promueve la supervivencia de células tumorales bajo estrés metabólico regulando los niveles de NADPH (Jeon y cols., 2012). En este contexto, y en contra de los efectos beneficiosos que se han sugerido a cerca de las terapias dirigidas a la inhibición de mTOR en cáncer (Janes y cols., 2010; Silvera y cols., 2010; van Veelen y cols., 2011), nuestros resultados desaconsejan las terapias dirigidas a la activación de AMPK y la inhibición de mTOR en el tratamiento del cáncer de colon. Es posible que estas diferencias en la respuesta celular se deban a los diferentes mecanismos que tienen los distintos tipos de tejidos para regular la biogénesis y función de la mitocondria (Scarpulla, 2008).

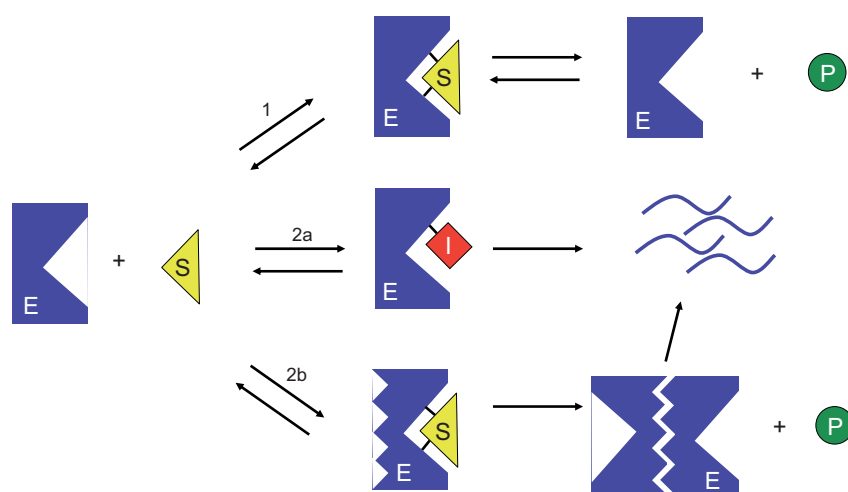
Por otro lado, nuestros resultados muestran que la activación de la vía GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 está implicada en reprimir la función bioenergética de la mitocondria (Fig. 44). Prueba de ello es que el silenciamiento de ATF4 restaura la función bioenergética de la mitocondria (Fig. 24). La activación de esta vía estaría permitiendo a las células G reconfigurar la expresión génica para adaptarse al estrés bioenergético impuesto. En este sentido, se pone de manifiesto la primera evidencia de la implicación de esta vía para controlar la respuesta al estrés cuando la función bioenergética de la mitocondria está bloqueada.

En general, concluimos que la activación persistente de AMPK y GCN2 (Fig. 44) regula el balance entre la glucólisis y la fosforilación oxidativa, reprimiendo específicamente la traducción de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo. La activación de estas vías de señalización es esencial para implementar una respuesta satisfactoria que permita a las células cancerígenas sobrevivir en condiciones de estrés metabólico. En definitiva, demostramos la implicación de nuevas vías de señalización en la adquisición del fenotipo compatible con la progresión tumoral en cáncer de colon.

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que la reprogramación metabólica de la célula tumoral pasa imprescindiblemente por la regulación del recambio de las proteínas implicadas en el mismo. Así, en las células G se observa una fuerte estabilización de las proteínas mitocondriales,  $\beta$ -F1-ATPasa y Hsp60 y un recambio mucho mayor de las enzimas glucolíticas GAPDH y PK (Fig. 25). Estos resultados aportan la primera evidencia experimental de que los catalizadores biológicos, a diferencia de los catalizadores químicos, se gastan en función de la actividad que desempeñan. Congruente con esta premisa se observa que el tratamiento de las células con DMOG reproduce los cambios

antagónicos observados en el recambio de las proteínas mitocondriales y glucolíticas (Fig. 32). Así mismo, la activación glucolítica por  $\text{CoCl}_2$  aumenta de manera muy pronunciada el recambio de la proteína GAPDH (Fig. 29,30). Es decir que la activación/represión de la glucolisis y de la fosforilación oxidativa está asociada con la regulación de la vida media de las proteínas implicadas en cada una de estas vías metabólicas, de manera que, a mayor actividad metabólica mayor recambio de las proteínas implicadas.

Las diferencias en la vida media de las proteínas entre las distintas condiciones, indican cambios en los sistemas de degradación de las mismas. La pregunta que surge es cuáles son las señales o mecanismos que regulan de forma diferencial el recambio de las proteínas del metabolismo energético en base a su actividad biológica. Una posible explicación es que la formación del complejo enzima-sustrato en el centro activo del enzima conduzca en algunos casos a intermediarios covalentes irreversibles en un porcentaje que sea función del número de ciclos catalíticos de tal manera que a mayor actividad mayor daño irreversible del centro activo, y por tanto mayor degradación del enzima (Fig. 45). Alternativamente, también se puede pensar que los cambios conformacionales producidos en las enzimas durante la catálisis conduzcan, también en un porcentaje dependiente de su actividad, a la formación de agregados proteicos que inactivan el enzima (Fig. 45). Esto sería de más relevancia en el caso de complejos multiproteicos como ocurre con las enzimas de la glucolisis (Bennett y Steitz, 1978) e incluso con los supercomplejos de la fosforilación oxidativa (Lenaz y Genova, 2007). En definitiva, el hecho de que las enzimas tengan que catalizar la transformación de sustrato mucho más frecuentemente por unidad de tiempo, puede hacer que éstas estén más expuestas a posibles modificaciones ya sean covalentes o por interacción hidrofóbica que en última instancia conducirían a su inactivación y por tanto tendrían que ser degradadas.



**Figura 45. Actividad enzimática y degradación.** 1. La catálisis enzimática es un proceso reversible que requiere la formación del complejo enzima-sustrato [E-S] para la transformación del sustrato [S] en producto [P]. 2a. En la formación de este complejo se pueden formar intermediarios covalentes irreversibles entre el centro activo del

enzima [E] y el sustrato en el estado de transición [I] que conduzca a un complejo inactivo del centro activo inactivando al enzima. 2b. Los cambios conformacionales que se producen en las enzimas durante la catálisis podrían provocar la formación de agregados hidrofóbicos que también conducirían a su inactivación. En ambos casos la inactivación del enzima conduciría a su degradación. A mayor número de ciclos catalíticos del enzima, mayor probabilidad de que se produzcan los mecanismos inhibitorios de su actividad.

Además, las células G están sometidas a un estrés bioenergético citoplasmático, que conlleva el aumento de ROS lo que podría dañar e inactivar por oxidación de forma selectiva las proteínas de la glucólisis conduciendo a agregados de proteína inactiva (Dobson, 2003). En este contexto, los sistemas de control de calidad de las proteínas tales como chaperonas y proteasas se tienen que activar para desagregar, volver a plegar correctamente o degradar las proteínas dañadas (Hu y Liu, 2011). En las células G, los sistemas de control de calidad de las proteínas mitocondriales serán mucho menos importantes ya que el metabolismo oxidativo de la mitocondria está muy reprimido (Fig. 10).

En las células eucariotas, además de la acción de las chaperonas en la estabilización de proteínas (Hartl y cols., 2011), la proteólisis representa el mecanismo de defensa más importante en contra de la acumulación de polipéptidos dañados. La mayor proteasa citoplasmática es el proteasoma, un complejo multiproteico dependiente de ATP que degrada proteínas citoplasmáticas que han sido previamente ubiquitinizadas (Kostova y Wolf, 2003). El estudio de la implicación del proteasoma en el desarrollo de este trabajo mostró que esta vía de degradación no está implicada en la reprogramación metabólica de las células de carcinoma de colon ya que la inhibición farmacológica del proteasoma no produjo ningún efecto en la expresión de las proteínas estudiadas (Fig. 28).

La mitocondria contiene sus propias enzimas proteolíticas (Koppen y Langer, 2007). Lon y ClpXP son serin proteasas dependientes de ATP que están presentes en la matriz mitocondrial y están altamente conservadas (Koppen y Langer, 2007). Mientras que se desconocen las funciones fisiológicas de ClpXP, se sabe que Lon es responsable de la degradación de la mayoría de las proteínas solubles de la matriz (Wang y cols., 1993; Van Dyck y cols., 1994; Major y cols., 2006). Otros dos sistemas proteolíticos, las proteasas m-AAA y las i-AAA se localizan en la membrana interna mitocondrial y está implicadas en la biogénesis de los complejos de la membrana interna y en la degradación de las subunidades no ensambladas (Langer, 2000). No se han identificado mecanismos que marquen las proteínas mitocondriales mediante modificaciones covalentes como el sistema de ubiquitinación en el citosol. Así, la información sobre el grado de recambio de proteínas mitocondriales y los mecanismos moleculares que marcan a las proteínas mitocondriales para su proteólisis es muy limitada. En el contexto de nuestro trabajo, no podemos excluir la participación de los sistemas de degradación mitocondriales en la regulación de la vida media de las proteínas del orgánulo en situaciones de estrés celular. En efecto, el estrés oxidativo que se presenta en las células G, podría estar mediando la inactivación de la Lon proteasa (Stanyer y cols., 2008), que se ha relacionado tanto con el envejecimiento (Bakala y cols., 2003) como con la patogénesis de enfermedades complejas entre ellas el cáncer (Bulteau y Bayot, 2011). Es decir, que el silenciamiento de la actividad de la Lon proteasa mediado por ROS estaría permitiendo la estabilización de proteínas mitocondriales en las células G.

El proteoma mitocondrial es muy dinámico y se producen cambios muy característicos según el estado funcional de la célula y las condiciones ambientales. Este hecho no es de extrañar puesto que sabemos que las mitocondrias son específicas de cada tejido y pueden adaptar su fenotipo a los requerimientos celulares (Pagliarini y cols., 2008). Debido a la relevancia del microambiente tumoral, numerosos estudios sugieren que la hipoxia podría tener un papel importante en promover los cambios metabólicos necesarios para el desarrollo del tumor (Chiche y cols., 2010; Semenza, 2010). El tratamiento de las células con el mimético de hipoxia  $\text{CoCl}_2$  promovió un aumento en la degradación de todas las proteínas, tanto las mitocondriales como las glucolíticas (Fig. 29). Además, el estudio de la velocidad inicial de síntesis de las proteínas estudiadas reveló la ausencia de cambios significativos en su traducción entre las células que sobre-expresan HIF1 $\alpha$  y las células control (Fig. 31). Es decir, que la inducción de HIF1 $\alpha$  no está mediando las diferencias en la regulación de la vida media de las proteínas implicadas en el metabolismo energético a pesar de promover una significativa represión de la fosforilación oxidativa y un aumento de la glucólisis (Fig. 30). Estos resultados concuerdan con los datos de vida media de las proteínas, ya que en todos los casos la vida media de las proteínas estudiadas es mayor de 6h que es el tiempo de tratamiento con  $\text{CoCl}_2$ . Además, estos resultados están de acuerdo con estudios previos que demuestran que los mecanismos que controlan la adaptación a hipoxia inducida por  $\text{CoCl}_2$  no dependen de la actividad mitocondrial (Chandel y cols., 1998). Por contra, nuestros resultados muestran que la actividad parcial de mTOR (Fig. 17) es necesaria para la regulación diferencial en la vida media de las proteínas del metabolismo energético ya que la inhibición farmacológica de mTOR mediante el tratamiento con Torin1, que inhibe la traducción global de proteínas, bloquea la síntesis de proteínas de la glucólisis y de la mitocondria (Fig. 28).

En el mismo sentido, las células tratadas con DMOG, un inhibidor de las prolil-hidroxilasas, presentaban un fenotipo muy similar a las células tratadas con OL. La inhibición de las prolil-hidroxilasas promueve la estabilización de las proteínas mitocondriales  $\beta$ -F1 y Hsp60 al mismo tiempo que reprime su síntesis e induce una fuerte inhibición de la respiración mitocondrial (Fig. 32 y 33). Por contra, en estas condiciones, aumenta mucho el recambio y la velocidad de síntesis de GAPDH, y consecuentemente aumenta el flujo glucolítico, tal y como ocurría en las células G (Fig. 31 y 32). Es decir que existe la misma relación entre la actividad metabólica de la célula y la síntesis y el recambio de las proteínas implicadas en el metabolismo celular cuando se tratan las células con OL y con DMOG. Además, la inhibición de las prolil-hidroxilasas también se refleja en un aumento de la proliferación celular, siendo éste otro punto en común con las células G (Fig. 34). Estos resultados sugieren que la actividad de las prolil-hidroxilasas está inhibida en las células G. Esta inhibición puede imputarse a la mayor producción de ROS presente en estas células (Pan y cols., 2007). El hecho de que ante un estrés oxidativo inducido mediante el tratamiento de las células con peróxido de hidrógeno se inhiba la síntesis de

proteínas mitocondriales e induzca la síntesis de GAPDH enfatiza la posible participación de los ROS en la regulación de las prolil-hidroxilasas para reprogramar el metabolismo energético de las células de carcinoma colorrectal.

Estos resultados en su conjunto destacan la enorme relevancia de las prolil-hidroxilasas y en definitiva de la modificación covalente por hidroxilación de prolinas de proteínas de la maquinaria de la traducción para regular de forma diferencial la síntesis y degradación de las proteínas del metabolismo energético en las células de carcinoma de colon. Además, estos resultados sugieren que la hidroxilación de uno o varios factores de traducción o bien de componentes del ribosoma están implicados en la regulación diferencial de la traducción de las proteínas mitocondriales y enzimas de la glucolisis.

La regulación de la traducción de las proteínas implicadas en el metabolismo energético es clave en la reprogramación metabólica de las células que adquieren el fenotipo agresivo. La diferencias que se aprecian en la expresión de los factores de iniciación de la traducción entre las células M y G confirma la importancia de la fase de iniciación para regular diferencialmente la traducción de proteínas (Tabla 7) (Silvera y cols., 2010). Así, se observan cambios en la abundancia relativa de los factores de traducción como posibles modificaciones covalentes de éstos entre las células M y G (Fig. 36 y 37). Estos cambios podrían estar mediados por el estrés oxidativo que sufren las células G. En efecto, el peróxido de hidrógeno inhibe la síntesis de proteínas mitocondriales de manera específica (Fig. 35) y los ROS inhiben la actividad de las prolil-hidroxilasas (Pan y cols., 2007), cuya actividad hemos visto que es imprescindible para la traducción selectiva de proteínas mitocondriales (Fig. 32 y 34). En concreto, las células G tienen una menor expresión de una serie de factores de iniciación de la traducción (Tabla 7, filas en azul) que los haría presumiblemente necesarios para la traducción de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo ya que la síntesis global de proteínas no se ve afectada en estas células (Fig. 17). En este sentido, el silenciamiento de los factores de iniciación de la traducción eIF3D y eIF3E en las células M demuestra que son necesarios para la traducción eficiente y específica de proteínas mitocondriales mientras que su silenciamiento no tiene repercusión aparente sobre la síntesis de GAPDH. Por contra, el silenciamiento de los factores eIF3A y eIF4E demuestra su necesidad para la síntesis eficiente tanto de las proteínas mitocondriales como de la glucolítica GAPDH. De forma coherente con la implicación de las prolil-hidroxilasas en la regulación de la traducción selectiva de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo, hemos demostrado que el tratamiento con DMOG también reprime la expresión de los factores de iniciación de la traducción que promueve el estrés metabólico con oligomicina (Fig. 38).

Es destacable que otros factores de iniciación están más expresados en células G que en células M (Tabla 7, filas en rojo), lo que posiblemente los hace más relevantes para la traducción de mRNAs de la vía glucolítica. La traducción IRES-dependiente de algunos mRNAs requiere altos niveles de expresión del factor eIF4G, que se une a la secuencia

IRES y recluta la subunidad 40S del ribosoma y el factor de iniciación eIF3 (Braunstein y cols., 2007; Silvera y Schneider, 2009). En este sentido es interesante destacar que las células G tienen mayor expresión del factor eIF4G1 (Tabla 7) que podría estar favoreciendo la traducción de mRNAs de la glucólisis también mediante mecanismos IRES-dependientes en situaciones de estrés. También se ha descrito que la sobre-expresión de eIF6 (Tabla 7) podría incrementar la proliferación celular porque aumenta la biogénesis de los ribosomas (Silvera y cols., 2010). Congruentemente con la mayor capacidad proliferativa de las células G (Fig. 14), este factor está más expresado en estas células y podría estar confiriendo ventaja traduccional a los mRNAs de la vía glucolítica.

Desde el punto de vista del mecanismo, la regulación de la traducción de los mRNAs se puede explicar por diferencias en la afinidad de éstos por la maquinaria de traducción (Willers y Cuezva, 2011). En este sentido se ha descrito como la región 3'UTR de  $\beta$ -mRNA es clave para que éste se localice y traduzca eficientemente (Izquierdo y Cuezva, 1997; de Heredia y cols., 2000; Izquierdo y Cuezva, 2000; Ricart y cols., 2002; Willers y cols., 2010). En este trabajo, realizado durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Merrick con el  $\beta$ -mRNA humano en USA no pudimos reproducir el efecto enhancer observado para el 3'UTR de  $\beta$ -mRNA de rata (Fig. 40), posiblemente motivado por alguna diferencia en la secuencia/estructura del mRNA.

La sobre-expresión de eIF4E promueve la transformación y tumorigénesis incrementando selectivamente la traducción de una serie de mRNAs que tienen un 5'UTR muy estructurado (Koromilas y cols., 1992). Estos mRNAs en circunstancias normales tienen más dificultad a la hora de competir por el eIF4F (Fig. 7). Nuestros resultados demuestran que el 5'UTR de GAPDH es esencial para que el transcrito se traduzca eficientemente (Fig. 40), de hecho, actúa como una secuencia enhancer porque cuando se pone en *cis* a  $\beta$ -mRNA, éste aumenta su traducción (Fig. 40). Además, los resultados revelan que cuando los mRNAs de GAPDH y  $\beta$ -F1 compiten, la adición del factor eIF4F favorece la traducción del mRNA de GAPDH (Fig. 42). Paradójicamente con los resultados *in vivo* (Fig. 17 y 27), los ensayos *in vitro* demuestran una mayor dependencia del mRNA de GAPDH por eIF4F que  $\beta$ -mRNA (Fig. 42), que también se pone de manifiesto por la adición del inhibidor del cap (Fig. 43). En su conjunto estos resultados sugieren que en situaciones de estrés bioenergético como el que presentan las células G, los mRNAs de la glucólisis como GAPDH podrían contar con mecanismos alternativos de la vía de traducción (Holcik, 2004).

El aumento en la proliferación de las células cancerosas implica también el aumento en la síntesis de proteínas (Johnson y cols., 1976). Congruentemente, no observamos diferencias en la síntesis global de proteínas entre células M y G. Presumiblemente, las diferencias en traducción estriban en la regulación diferencial de los factores de traducción que garantizan la traducción de los mRNAs que son compatibles con la supervivencia y la progresión tumoral, tales como los mRNAs que codifican las enzimas glucolíticas.



Muy recientemente, se ha descrito un mecanismo alternativo por el que las células en condiciones hipóxicas consiguen poner en marcha la síntesis de proteínas (Uniacke y cols., 2012). Las células en condiciones de bajo oxígeno utilizan una maquinaria de traducción alternativa compuesta por HIF2 $\alpha$ , la proteína de unión a RNA RBM4 y el factor de iniciación de la traducción eIF4E2 (Uniacke y cols., 2012). Este trabajo apoya nuestra hipótesis sobre la regulación de la expresión de los factores de iniciación de la traducción para favorecer la adaptación metabólica de las células en situaciones de estrés.





# ***CONCLUSIONES***



1. El estrés metabólico inducido por tratamiento con oligomicina promueve la activación (FAST1, p53, SP1, OCT, STAT3, TR y MEF2) y represión (AP2 y CEBP) de diversos factores de transcripción que median de forma combinada la represión de la función bioenergética de la mitocondria en células de carcinoma de colon propiciando los cambios en el metabolismo energético celular hacia una glucolisis aerobia más activa, el aumento de la capacidad proliferativa de las células y la activación de las vías de señalización implicadas en tumorigénesis. Estos datos ponen de manifiesto la relevancia del fenotipo bioenergético en el control de las rutas que promueven supervivencia y muerte celular y validan el modelo experimental planteado.
2. La adquisición del fenotipo agresivo en carcinoma colorrectal implica la represión de la expresión de proteínas con función bioenergética y metabólica de la mitocondria. Específicamente, a nivel de la H<sup>+</sup>-ATP sintasa, se produce por represión de la traducción del mRNA que codifica la subunidad catalítica del complejo ( $\beta$ -F1-ATPasa) en ausencia de cambios en la síntesis y expresión de proteínas de la vía glucolítica. Estos resultados ponen de manifiesto, por vez primera, la regulación diferencial de los mecanismos que controlan el metabolismo energético de la célula tumoral.
3. La desdiferenciación bioenergética de la mitocondria en cáncer de colon está mediada por la activación combinada de las quinasas que responden a estrés, AMPK y GCN2.
4. La reprogramación metabólica de la célula tumoral inducida por oligomicina requiere del ajuste en el recambio de las proteínas implicadas en el metabolismo energético. Así, se produce la estabilización de las proteínas mitocondriales y una mayor degradación de las enzimas de la vía glucolítica. Es decir, el aumento del recambio de las enzimas se produce por un aumento del flujo metabólico a través de la vía o de los ciclos catalíticos que realiza la enzima *in vivo*. La regulación diferencial de las proteínas del metabolismo energético parece estar regulado, al menos parcialmente, por la vía de señalización de mTOR pero no depende de la actividad del proteasoma ni de la sobre-expresión de HIF1 $\alpha$ .
5. La actividad de las prolin-hidroxilasas es necesaria para la síntesis y el recambio de proteínas mitocondriales en células de carcinoma de colon. Las especies reactivas de oxígeno que están aumentadas en células tratadas con oligomicina están muy probablemente participando en la inhibición de la actividad de las prolin-hidroxilasas.

6. La expresión diferencial y modificación covalente de los factores de iniciación de la traducción propicia la traducción de los mRNAs que son compatibles con la supervivencia y la progresión tumoral. La traducción eficiente de proteínas mitocondriales es más dependiente de los factores de iniciación de la traducción eIF3D y eIF3E que la traducción de los mRNAs de la glucólisis.
  
7. El 5'UTR del mRNA de la proteína de la glucólisis GAPDH actúa como una secuencia intensificadora de su traducción *in vitro* y podría estar confiriendo ventaja traduccional a este mRNA en situaciones de estrés metabólico ya que tiene una gran afección por el complejo de iniciación de la traducción eIF4F.

## ***CONCLUSIONS***





1. Metabolic stress induced by oligomycin treatment promotes de activation (FAST1, p53, SP1, OCT, STAT3, TR y MEF2) and repression (AP2 y CEBP) of several transcription factors that co-ordinately mediate the repression of the bioenergetic function of mitochondria in colon cancer cells leading to the activation of an enhanced aerobic glycolysis, an increase in cellular proliferation and the activation of signalling pathways involved in tumorigenesis. These findings reveal the relevance of the bioenergetic phenotype in the regulation of pathways that promote cellular survival and cell death and validate the experimental system developed.
2. The acquisition of the aggressive phenotype in colon cancer cells involves the repression of the expression of mitochondrial proteins involved in the bioenergetic and metabolic functions of the organelle. Specifically, the mRNA that encodes the catalytic subunit of the H<sup>+</sup>-ATP synthase ( $\beta$ -F1-ATPase) is translationally repressed in the absence of changes in the synthesis and expression of proteins of the glycolytic pathway. These results provide the first evidence of a differential regulation of the mechanisms that regulate energy metabolism in tumor cells.
3. The bioenergetic dedifferentiation of mitochondria in colon cancer cells is mediated by the combined activation of the stress kinases AMPK and GCN2.
4. Metabolic reprogramming of tumor cells induced by oligomycin treatment requires the regulation of the turnover of proteins involved in energy metabolism. In this regard, mitochondrial proteins are stabilized whereas the degradation of glycolytic enzymes is enhanced. In others words, the increase in the turnover of the enzymes is promoted by an increase in the metabolic flux through the pathway or by the numbers of catalytic cycles performed by the enzymes *in vivo*. The mTOR signalling pathway seems to be involved in the differential regulation of the synthesis of proteins of energy metabolism. HIF1 $\alpha$  over-expression and the activity of the proteasome are not involved in metabolic reprogramming of oligomycin treated colon cancer cells.
5. The activity of prolyl-hydroxylases is required for the synthesis and turnover of mitochondrial proteins. Reactive oxygen species most likely mediate the inhibition of the activity of prolyl-hydroxylases.
6. The differential expression and covalent modification of translation initiation factors could promote the translation of the mRNAs that are compatible with cell survival and tumor progression. In this regard, we illustrate that the efficient translation of mitochondrial proteins is more dependent on translation initiation factors eIF3D and eIF3E than translation of the glycolytic mRNAs.

7. 5'UTR of the glycolytic GAPDH mRNA is an *in vitro* enhancer of its translation that could confer a translation advantage under stressful conditions because it has a high affinity for the translation initiation complex eIF4F.

# ***BIBLIOGRAFÍA***



**Abdelhaleem, M** (2004). Over-expression of RNA helicases in cancer. *Anticancer Res* 24: 3951-3953.

**Abrahams, JP, Leslie, AG, Lutter, R, Walker, JE** (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria [see comments]. *Nature* 370: 621-628.

**Acebo, P, Giner, D, Calvo, P, Blanco-Rivero, A, Ortega, AD, Fernandez, PL, Roncador, G, Fernandez-Malave, E, Chamorro, M, Cuezva, JM** (2009). Cancer abolishes the tissue type-specific differences in the phenotype of energetic metabolism. *Transl Oncol* 2: 138-145.

**Acin-Perez, R, Fernandez-Silva, P, Peleato, ML, Perez-Martos, A, Enriquez, JA** (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Molecular cell* 32: 529-539.

**Ackerman, SH, Tzagoloff, A** (2005). Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 80: 95-133.

**Aldea, M, Clofent, J, Nunez de Arenas, C, Chamorro, M, Velasco, M, Berrendero, JR, Navarro, C, Cuezva, JM** (2011). Reverse phase protein microarrays quantify and validate the bioenergetic signature as biomarker in colorectal cancer. *Cancer Lett* 311: 210-218.

**Almeida, A, Bolanos, JP, Moncada, S** (2010). E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 738-741.

**Aragones, J, Schneider, M, Van Geyte, K, Fraisl, P, Dresselaers, T, Mazzone, M, Dirkx, R, Zacchigna, S, Lemieux, H, Jeoung, NH, Lambrechts, D, Bishop, T, Lafuste, P, Diez-Juan, A, Harten, SK, Van Noten, P, De Bock, K, Willam, C, Tjwa, M, Grosfeld, A, Navet, R, Moons, L, Vandendriessche, T, Deroose, C, Wijeyekoon, B, Nuyts, J, Jordan, B, Silasi-Mansat, R, Lupu, F, Dewerchin, M, Pugh, C, Salmon, P, Mortelmans, L, Gallez, B, Gorus, F, Buyse, J, Sluse, F, Harris, RA, Gnaiger, E, Hespel, P, Van Hecke, P, Schuit, F, Van Veldhoven, P, Ratcliffe, P, Baes, M, Maxwell, P, Carmeliet, P** (2008). Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet* 40: 170-180.

**Attardi, G, Schatz, G** (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4: 289-333.

**Baba, Y, Nosh, K, Shima, K, Meyerhardt, JA, Chan, AT, Engelman, JA, Cantley, LC, Loda, M, Giovannucci, E, Fuchs, CS, Ogino, S** (2010). Prognostic significance of AMP-activated protein kinase expression and modifying effect of MAPK3/1 in colorectal cancer. *British journal of cancer* 103: 1025-1033.

**Bailey, KM, Wojtkowiak, JW, Hashim, AI, Gillies, RJ** (2012). Targeting the metabolic microenvironment of tumors. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)* 65: 63-107.

**Bakala, H, Delaval, E, Hamelin, M, Bismuth, J, Borot-Laloi, C, Corman, B, Friguet, B** (2003). Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N(epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix. *European journal of*

*biochemistry / FEBS* 270: 2295-2302.

**Barbosa, IA, Machado, NG, Skildum, AJ, Scott, PM, Oliveira, PJ** (2012). Mitochondrial remodeling in cancer metabolism and survival: Potential for new therapies. *Biochimica et biophysica acta* 1826: 238-254.

**Barna, M, Pusic, A, Zollo, O, Costa, M, Kondrashov, N, Rego, E, Rao, PH, Ruggero, D** (2008). Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature* 456: 971-975.

**Barnes, CJ, Li, F, Mandal, M, Yang, Z, Sahin, AA, Kumar, R** (2002). Heregulin induces expression, ATPase activity, and nuclear localization of G3BP, a Ras signaling component, in human breast tumors. *Cancer research* 62: 1251-1255.

**Benard, G, Bellance, N, James, D, Parrone, P, Fernandez, H, Letellier, T, Rossignol, R** (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 120: 838-848.

**Benne, R, Brown-Luedi, ML, Hershey, JW** (1978). Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D, and eIF-5 from rabbit reticulocytes. *The Journal of biological chemistry* 253: 3070-3077.

**Bennett, WS, Jr., Steitz, TA** (1978). Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75: 4848-4852.

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

**Berlanga, JJ, Santoyo, J, De Haro, C** (1999). Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. *European journal of biochemistry / FEBS* 265: 754-762.

**Berlanga, JJ, Ventoso, I, Harding, HP, Deng, J, Ron, D, Sonenberg, N, Carrasco, L, de Haro, C** (2006). Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. *The EMBO journal* 25: 1730-1740.

**Bi, M, Naczki, C, Koritzinsky, M, Fels, D, Blais, J, Hu, N, Harding, H, Novoa, I, Varia, M, Raleigh, J, Scheuner, D, Kaufman, RJ, Bell, J, Ron, D, Wouters, BG, Koumenis, C** (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *The EMBO journal* 24: 3470-3481.

**Biswas, G, Adebajo, OA, Freedman, BD, Anandatheerthavarada, HK, Vijayasathy, C, Zaidi, M, Kotlikoff, M, Avadhani, NG** (1999). Retrograde Ca<sup>2+</sup> signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *The EMBO journal* 18: 522-533.

**Blenkiron, C, Goldstein, LD, Thorne, NP, Spiteri, I, Chin, SF, Dunning, MJ, Barbosa-**

- Morais, NL, Teschendorff, AE, Green, AR, Ellis, IO, Tavare, S, Caldas, C, Miska, EA** (2007). MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome biology* 8: R214.
- Bottero, V, Rossi, F, Samson, M, Mari, M, Hofman, P, Peyron, JF** (2001). Ikappa b-alpha, the NF-kappa B inhibitory subunit, interacts with ANT, the mitochondrial ATP/ADP translocator. *The Journal of biological chemistry* 276: 21317-21324.
- Boyer, PD** (1993). The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta* 1140: 215-250.
- Boyer, PD** (1997b). The ATP synthase. A splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66: 717-749.
- Brand, K, Aichinger, S, Forster, S, Kupper, S, Neumann, B, Nurnberg, W, Ohrisch, G** (1988). Cell-cycle-related metabolic and enzymatic events in proliferating rat thymocytes. *European journal of biochemistry / FEBS* 172: 695-702.
- Brand, KA, Hermfisse, U** (1997). Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J* 11: 388-395.
- Brandon, M, Baldi, P, Wallace, DC** (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 25: 4647-4662.
- Braunstein, S, Karpisheva, K, Pola, C, Goldberg, J, Hochman, T, Yee, H, Cangiarella, J, Arju, R, Formenti, SC, Schneider, RJ** (2007). A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Molecular cell* 28: 501-512.
- Breen, GA** (1988). Bovine liver cDNA clones encoding a precursor of the alpha-subunit of the mitochondrial ATP synthase complex. *Biochem Biophys Res Commun* 152: 264-269.
- Bruick, RK, McKnight, SL** (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294: 1337-1340.
- Brunelle, JK, Bell, EL, Quesada, NM, Vercauteren, K, Tiranti, V, Zeviani, M, Scarpulla, RC, Chandel, NS** (2005). Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell metabolism* 1: 409-414.
- Brunn, GJ, Hudson, CC, Sekulic, A, Williams, JM, Hosoi, H, Houghton, PJ, Lawrence, JC, Jr., Abraham, RT** (1997). Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277: 99-101.
- Buckendahl, AC, Budczies, J, Fiehn, O, Darb-Esfahani, S, Kind, T, Noske, A, Weichert, W, Sehouli, J, Braicu, E, Dietel, M, Denkert, C** (2011). Prognostic impact of AMP-activated protein kinase expression in ovarian carcinoma: correlation of protein expression and GC/TOF-MS-based metabolomics. *Oncology reports* 25: 1005-1012.
- Bulteau, AL, Bayot, A** (2011). Mitochondrial proteases and cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1807: 595-601.



**Bussing, I, Slack, FJ, Grosshans, H** (2008). let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends in molecular medicine* 14: 400-409.

**Butow, RA, Avadhani, NG** (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Molecular cell* 14: 1-15.

**Cabezón, E, Butler, PJ, Runswick, MJ, Walker, JE** (2000). Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *The Journal of biological chemistry* 275: 25460-25464.

**Calin, GA, Croce, CM** (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6: 857-866.

**Calin, GA, Dumitru, CD, Shimizu, M, Bichi, R, Zupo, S, Noch, E, Aldler, H, Rattan, S, Keating, M, Rai, K, Rassenti, L, Kipps, T, Negrini, M, Bullrich, F, Croce, CM** (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 15524-15529.

**Calin, GA, Sevignani, C, Dumitru, CD, Hyslop, T, Noch, E, Yendamuri, S, Shimizu, M, Rattan, S, Bullrich, F, Negrini, M, Croce, CM** (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 2999-3004.

**Campanella, M, Casswell, E, Chong, S, Farah, Z, Wieckowski, MR, Abramov, AY, Tinker, A, Duchon, MR** (2008). Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell metabolism* 8: 13-25.

**Capaldi, RA, Aggeler, R** (2002). Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem Sci* 27: 154-160.

**Caramuta, S, Egyhazi, S, Rodolfo, M, Witten, D, Hansson, J, Larsson, C, Lui, WO** (2010). MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma. *The Journal of investigative dermatology* 130: 2062-2070.

**Carmona-Saez, P, Chagoyen, M, Tirado, F, Carazo, JM, Pascual-Montano, A** (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome biology* 8: R3.

**Carmona, MC, Iglesias, R, Obregon, MJ, Darlington, GJ, Villarroya, F, Giralt, M** (2002). Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *The Journal of biological chemistry* 277: 21489-21498.

**Cizkova, A, Stranecky, V, Mayr, JA, Tesarova, M, Havlickova, V, Paul, J, Ivanek, R, Kuss, AW, Hansikova, H, Kaplanova, V, Vrbacky, M, Hartmannova, H, Noskova, L, Honzik, T, Drahotka, Z, Magner, M, Hejzlarova, K, Sperl, W, Zeman, J, Houstek, J, Kmoch, S** (2008). TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and

neonatal mitochondrial encephalocardiomyopathy. *Nat Genet* 40: 1288-1290.

**Coleman, LJ, Peter, MB, Teall, TJ, Brannan, RA, Hanby, AM, Honarpisheh, H, Shaaban, AM, Smith, L, Speirs, V, Verghese, ET, McElwaine, JN, Hughes, TA** (2009). Combined analysis of eIF4E and 4E-binding protein expression predicts breast cancer survival and estimates eIF4E activity. *British journal of cancer* 100: 1393-1399.

**Creighton, CJ, Reid, JG, Gunaratne, PH** (2009). Expression profiling of microRNAs by deep sequencing. *Briefings in bioinformatics* 10: 490-497.

**Cuezva, JM, Chen, G, Alonso, AM, Isidoro, A, Misek, DE, Hanash, SM, Beer, DG** (2004). The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* 25: 1157-1163.

**Cuezva, JM, Chitra, CI, Patel, MS** (1982). The newborn of diabetic rat. II. Impaired gluconeogenesis in the postnatal period. *Pediatr Res* 16: 638-643.

**Cuezva, JM, Krajewska, M, de Heredia, ML, Krajewski, S, Santamaria, G, Kim, H, Zapata, JM, Marusawa, H, Chamorro, M, Reed, JC** (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer research* 62: 6674-6681.

**Cuezva, JM, Ortega, AD, Willers, I, Sanchez-Cenizo, L, Aldea, M, Sanchez-Arago, M** (2009). The tumor suppressor function of mitochondria: translation into the clinics. *Biochimica et biophysica acta* 1792: 1145-1158.

**Cuezva, JM, Ostronoff, LK, Ricart, J, Lopez de Heredia, M, Di Liegro, CM, Izquierdo, JM** (1997). Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J Bioenerg Biomembr* 29: 365-377.

**Cuezva, JM, Sanchez-Arago, M, Sala, S, Blanco-Rivero, A, Ortega, AD** (2007). A message emerging from development: the repression of mitochondrial beta-F1-ATPase expression in cancer. *J Bioenerg Biomembr* 39: 259-265.

**Chandel, NS, Maltepe, E, Goldwasser, E, Mathieu, CE, Simon, MC, Schumacker, PT** (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 11715-11720.

**Chandel, NS, McClintock, DS, Feliciano, CE, Wood, TM, Melendez, JA, Rodriguez, AM, Schumacker, PT** (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *The Journal of biological chemistry* 275: 25130-25138.

**Chi, DS, Ramirez, PT, Teitcher, JB, Mironov, S, Sarasohn, DM, Iyer, RB, Eisenhauer, EL, Abu-Rustum, NR, Sonoda, Y, Levine, DA, Brown, CL, Aghajanian, C, Gershenson, DM, Hoskins, WJ, Hricak, H, Barakat, RR** (2007). Prospective study of the correlation between postoperative computed tomography scan and primary surgeon assessment in patients with advanced ovarian, tubal, and peritoneal carcinoma reported to have undergone primary surgical cytoreduction to residual disease 1 cm or less. *J Clin Oncol* 25: 4946-4951.

**Chiche, J, Rouleau, M, Gounon, P, Brahim-Horn, MC, Pouyssegur, J, Mazure, NM** (2010). Hypoxic enlarged mitochondria protect cancer cells from apoptotic stimuli. *J Cell Physiol* 222: 648-657.

**Chiu, CH, Lin, WD, Huang, SY, Lee, YH** (2004). Effect of a C/EBP gene replacement on mitochondrial biogenesis in fat cells. *Genes & development* 18: 1970-1975.

**Choo, AY, Blenis, J** (2009). Not all substrates are treated equally: implications for mTOR, rapamycin-resistance and cancer therapy. *Cell Cycle* 8: 567-572.

**Christofk, HR, Vander Heiden, MG, Harris, MH, Ramanathan, A, Gerszten, RE, Wei, R, Fleming, MD, Schreiber, SL, Cantley, LC** (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452: 230-233.

**D'Errico, I, Salvatore, L, Murzilli, S, Lo Sasso, G, Latorre, D, Martelli, N, Egorova, AV, Polishuck, R, Madeyski-Bengtson, K, Lelliott, C, Vidal-Puig, AJ, Seibel, P, Villani, G, Moschetta, A** (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha (PGC1alpha) is a metabolic regulator of intestinal epithelial cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 6603-6608.

**Dada, LA, Chandel, NS, Ridge, KM, Pedemonte, C, Bertorello, AM, Sznajder, JI** (2003). Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *J Clin Invest* 111: 1057-1064.

**Dang, CV** (2010). p32 (C1QBP) and cancer cell metabolism: is the Warburg effect a lot of hot air? *Mol Cell Biol* 30: 1300-1302.

**Dang, CV** (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes & development* 26: 877-890.

**Dang, L, White, DW, Gross, S, Bennett, BD, Bittinger, MA, Driggers, EM, Fantin, VR, Jang, HG, Jin, S, Keenan, MC, Marks, KM, Prins, RM, Ward, PS, Yen, KE, Liao, LM, Rabinowitz, JD, Cantley, LC, Thompson, CB, Vander Heiden, MG, Su, SM** (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462: 739-744.

**Darzynkiewicz, Z, Bruno, S, Del Bino, G, Gorczyca, W, Hotz, MA, Lassota, P, Traganos, F** (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13: 795-808.

**David, CJ, Chen, M, Assanah, M, Canoll, P, Manley, JL** (2010). HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* 463: 364-368.

**de Groof, AJ, te Lindert, MM, van Dommelen, MM, Wu, M, Willemse, M, Smift, AL, Winer, M, Oerlemans, F, Pluk, H, Franssen, JA, Wieringa, B** (2009). Increased OXPHOS activity precedes rise in glycolytic rate in H-RasV12/E1A transformed fibroblasts that develop a Warburg phenotype. *Mol Cancer* 8: 54.

- de Heredia, ML, Izquierdo, JM, Cuezva, JM** (2000). A conserved mechanism for controlling the translation of beta-F1-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 275: 7430-7437.
- DeBerardinis, RJ, Lum, JJ, Hatzivassiliou, G, Thompson, CB** (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism* 7: 11-20.
- Dobson, CM** (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* 426: 884-890.
- Dong, Z, Liu, LH, Han, B, Pincheira, R, Zhang, JT** (2004). Role of eIF3 p170 in controlling synthesis of ribonucleotide reductase M2 and cell growth. *Oncogene* 23: 3790-3801.
- Dong, Z, Zhang, JT** (2003). EIF3 p170, a mediator of mimosine effect on protein synthesis and cell cycle progression. *Mol Biol Cell* 14: 3942-3951.
- Dong, Z, Zhang, JT** (2006). Initiation factor eIF3 and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* 59: 169-180.
- Eberle, J, Krasagakis, K, Orfanos, CE** (1997). Translation initiation factor eIF-4A1 mRNA is consistently overexpressed in human melanoma cells in vitro. *Int J Cancer* 71: 396-401.
- Egea, G, Izquierdo, JM, Ricart, J, San Martín, C, Cuezva, JM** (1997). mRNA encoding the beta-subunit of the mitochondrial F1-ATPase complex is a localized mRNA in rat hepatocytes. *Biochem J* 322: 557-565.
- Emerling, BM, Weinberg, F, Snyder, C, Burgess, Z, Mutlu, GM, Viollet, B, Budinger, GR, Chandel, NS** (2009). Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radic Biol Med* 46: 1386-1391.
- Engelman, JA** (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9: 550-562.
- Epstein, AC, Gleadle, JM, McNeill, LA, Hewitson, KS, O'Rourke, J, Mole, DR, Mukherji, M, Metzen, E, Wilson, MI, Dhanda, A, Tian, YM, Masson, N, Hamilton, DL, Jaakkola, P, Barstead, R, Hodgkin, J, Maxwell, PH, Pugh, CW, Schofield, CJ, Ratcliffe, PJ** (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43-54.
- Esquela-Kerscher, A, Slack, FJ** (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 259-269.
- Falkenberg, M, Larsson, NG, Gustafsson, CM** (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76: 679-699.

**Fan, S, Ramalingam, SS, Kauh, J, Xu, Z, Khuri, FR, Sun, SY** (2009). Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4 (eIF4E) is elevated in human cancer tissues. *Cancer biology & therapy* 8: 1463-1469.

**Farazi, TA, Horlings, HM, Ten Hoeve, JJ, Mihailovic, A, Halfwerk, H, Morozov, P, Brown, M, Hafner, M, Reyat, F, van Kouwenhove, M, Kreike, B, Sie, D, Hovestadt, V, Wessels, LF, van de Vijver, MJ, Tuschl, T** MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer research* 71: 4443-4453.

**Favre, C, Zhdanov, A, Leahy, M, Papkovsky, D, O'Connor, R** (2010). Mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier (PNC1) regulates mitochondrial biogenesis and the invasive phenotype of cancer cells. *Oncogene* 29: 3964-3976.

**Fernandez-Silva, P, Enriquez, JA, Montoya, J** (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental physiology* 88: 41-56.

**Fernandez-Vizarra, E, Enriquez, JA, Perez-Martos, A, Montoya, J, Fernandez-Silva, P** (2008). Mitochondrial gene expression is regulated at multiple levels and differentially in the heart and liver by thyroid hormones. *Curr Genet* 54: 13-22.

**Finkel, T** (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 194: 7-15.

**Flavin, RJ, Smyth, PC, Finn, SP, Laios, A, O'Toole, SA, Barrett, C, Ring, M, Denning, KM, Li, J, Aherne, ST, Aziz, NA, Alhadi, A, Sheppard, BL, Loda, M, Martin, C, Sheils, OM, O'Leary, JJ** (2008). Altered eIF6 and Dicer expression is associated with clinicopathological features in ovarian serous carcinoma patients. *Mod Pathol* 21: 676-684.

**Formentini, L, Martinez-Reyes, I, Cuezva, JM** (2010). The mitochondrial bioenergetic capacity of carcinomas. *IUBMB Life* 62: 554-560.

**Formentini, L, Sánchez-Aragó, M, Sánchez-Cenizo, L, Cuezva, JM** (2012). The mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) triggers a ROS-mediated retrograde pro-survival and proliferative response. *Mol Cell* 45: 731-742.

**Fryer, LG, Fougelle, F, Barnes, K, Baldwin, SA, Woods, A, Carling, D** (2002). Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem J* 363: 167-174.

**Fukuda, R, Zhang, H, Kim, JW, Shimoda, L, Dang, CV, Semenza, GL** (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129: 111-122.

**Funes, JM, Quintero, M, Henderson, S, Martinez, D, Qureshi, U, Westwood, C, Clements, MO, Bourboulia, D, Pedley, RB, Moncada, S, Boshoff, C** (2007). Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 6223-6228.

**Gallouzi, IE, Parker, F, Chebli, K, Maurier, F, Labourier, E, Barlat, I, Capony, JP,**

**Tocque, B, Tazi, J** (1998). A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol Cell Biol* 18: 3956-3965.

**Gandin, V, Miluzio, A, Barbieri, AM, Beugnet, A, Kiyokawa, H, Marchisio, PC, Biffo, S** (2008). Eukaryotic initiation factor 6 is rate-limiting in translation, growth and transformation. *Nature* 455: 684-688.

**Gao, P, Tchernyshyov, I, Chang, TC, Lee, YS, Kita, K, Ochi, T, Zeller, KI, De Marzo, AM, Van Eyk, JE, Mendell, JT, Dang, CV** (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458: 762-765.

**Garcia-Rodriguez, LJ, Gay, AC, Pon, LA** (2007). Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *J Cell Biol* 176: 197-207.

**Garcia, M, Darzacq, X, Delaveau, T, Jourden, L, Singer, RH, Jacq, C** (2007). Mitochondria-associated yeast mRNAs and the biogenesis of molecular complexes. *Mol Biol Cell* 18: 362-368.

**Garcia, M, Delaveau, T, Goussard, S, Jacq, C** (2010). Mitochondrial presequence and open reading frame mediate asymmetric localization of messenger RNA. *EMBO reports* 11: 285-291.

**Gerber, AP, Herschlag, D, Brown, PO** (2004). Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol* 2: E79.

**Giovannetti, E, Funel, N, Peters, GJ, Del Chiaro, M, Erozenci, LA, Vasile, E, Leon, LG, Pollina, LE, Groen, A, Falcone, A, Danesi, R, Campani, D, Verheul, HM, Boggi, U** (2010). MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer research* 70: 4528-4538.

**Giraud, MF, Paumard, P, Soubannier, V, Vaillier, J, Arselin, G, Salin, B, Schaeffer, J, Brethes, D, di Rago, JP, Velours, J** (2002). Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae? *Biochimica et biophysica acta* 1555: 174-180.

**Gledhill, JR, Montgomery, MG, Leslie, AG, Walker, JE** (2007). How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 15671-15676.

**Gong, Y, Agani, FH** (2005). Oligomycin inhibits HIF-1alpha expression in hypoxic tumor cells. *American journal of physiology* 288: C1023-1029.

**Govindarajan, B, Sligh, JE, Vincent, BJ, Li, M, Canter, JA, Nickoloff, BJ, Rodenburg, RJ, Smeitink, JA, Oberley, L, Zhang, Y, Slingerland, J, Arnold, RS, Lambeth, JD, Cohen, C, Hilenski, L, Griendling, K, Martinez-Diez, M, Cuezva, JM, Arbiser,**

**JL** (2007). Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *J Clin Invest* 117: 719-729.

**Goyon, V, Fronzes, R, Salin, B, di-Rago, JP, Velours, J, Brethes, D** (2008). Yeast cells depleted in Atp14p fail to assemble Atp6p within the ATP synthase and exhibit altered mitochondrial cristae morphology. *The Journal of biological chemistry* 283: 9749-9758.

**Graff, JR, Konicek, BW, Carter, JH, Marcusson, EG** (2008). Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer research* 68: 631-634.

**Grifo, JA, Tahara, SM, Leis, JP, Morgan, MA, Shatkin, AJ, Merrick, WC** (1982). Characterization of eukaryotic initiation factor 4A, a protein involved in ATP-dependent binding of globin mRNA. *The Journal of biological chemistry* 257: 5246-5252.

**Grifo, JA, Tahara, SM, Morgan, MA, Shatkin, AJ, Merrick, WC** (1983). New initiation factor activity required for globin mRNA translation. *The Journal of biological chemistry* 258: 5804-5810.

**Guertin, DA, Sabatini, DM** (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell* 12: 9-22.

**Guitard, E, Parker, F, Millon, R, Abecassis, J, Tocque, B** (2001). G3BP is overexpressed in human tumors and promotes S phase entry. *Cancer Lett* 162: 213-221.

**Gusarova, GA, Dada, LA, Kelly, AM, Brodie, C, Witters, LA, Chandel, NS, Sznajder, JI** (2009). Alpha1-AMP-activated protein kinase regulates hypoxia-induced Na,K-ATPase endocytosis via direct phosphorylation of protein kinase C zeta. *Mol Cell Biol* 29: 3455-3464.

**Guzy, RD, Hoyos, B, Robin, E, Chen, H, Liu, L, Mansfield, KD, Simon, MC, Hammerling, U, Schumacker, PT** (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell metabolism* 1: 401-408.

**Hackenbrock, CR, Chazotte, B, Gupte, SS** (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 18: 331-368.

**Haines, GK, 3rd, Panos, RJ, Bak, PM, Brown, T, Zielinski, M, Leyland, J, Radosevich, JA** (1998). Interferon-responsive protein kinase (p68) and proliferating cell nuclear antigen are inversely distributed in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 19: 52-59.

**Haines, GK, Ghadge, GD, Becker, S, Kies, M, Pelzer, H, Thimmappaya, B, Radosevich, JA** (1993). Correlation of the expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (p68) with differentiation in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Archiv* 63: 289-295.

**Hamanaka, RB, Chandel, NS** (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci* 35: 505-513.

**Hanahan, D, Weinberg, RA** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

**Hanahan, D, Weinberg, RA** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.

**Hao, W, Chang, CP, Tsao, CC, Xu, J** (2010). Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization. *The Journal of biological chemistry* 285: 12647-12654.

**Hardie, DG, Scott, JW, Pan, DA, Hudson, ER** (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 546: 113-120.

**Harding, HP, Novoa, I, Zhang, Y, Zeng, H, Wek, R, Schapira, M, Ron, D** (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular cell* 6: 1099-1108.

**Hartl, FU, Bracher, A, Hayer-Hartl, M** (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475: 324-332.

**Henke, JI, Goergen, D, Zheng, J, Song, Y, Schuttler, CG, Fehr, C, Junemann, C, Niepmann, M** (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO journal* 27: 3300-3310.

**Hilger-Eversheim, K, Moser, M, Schorle, H, Buettner, R** (2000). Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 260: 1-12.

**Hirschhaeuser, F, Sattler, UG, Mueller-Klieser, W** (2011). Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer research* 71: 6921-6925.

**Holcik, M** (2004). Targeting translation for treatment of cancer--a novel role for IRES? *Current cancer drug targets* 4: 299-311.

**Holz, MK, Ballif, BA, Gygi, SP, Blenis, J** (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123: 569-580.

**Hsieh, AC, Liu, Y, Edlind, MP, Ingolia, NT, Janes, MR, Sher, A, Shi, EY, Stumpf, CR, Christensen, C, Bonham, MJ, Wang, S, Ren, P, Martin, M, Jessen, K, Feldman, ME, Weissman, JS, Shokat, KM, Rommel, C, Ruggero, D** (2012). The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* 485: 55-61.

**Hu, F, Liu, F** (2011). Mitochondrial stress: a bridge between mitochondrial dysfunction and metabolic diseases? *Cell Signal* 23: 1528-1533.

**Irvine, K, Stirling, R, Hume, D, Kennedy, D** (2004). Rasputin, more promiscuous than



ever: a review of G3BP. *Int J Dev Biol* 48: 1065-1077.

**Isidoro, A, Casado, E, Redondo, A, Acebo, P, Espinosa, E, Alonso, AM, Cejas, P, Hardisson, D, Fresno Vara, JA, Belda-Iniesta, C, Gonzalez-Baron, M, Cuezva, JM** (2005). Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26: 2095-2104.

**Isidoro, A, Martinez, M, Fernandez, PL, Ortega, AD, Santamaria, G, Chamorro, M, Reed, JC, Cuezva, JM** (2004). Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J* 378: 17-20.

**Izquierdo, JM, Cuezva, JM** (1997). Control of the translational efficiency of beta-F1-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Mol Cell Biol* 17: 5255-5268.

**Izquierdo, JM, Cuezva, JM** (2000). Internal-ribosome-entry-site functional activity of the 3'-untranslated region of the mRNA for the beta subunit of mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase. *Biochem J* 346 Pt 3: 849-855.

**Izquierdo, JM, Cuezva, JM** (2005). Epigenetic regulation of the binding activity of translation inhibitory proteins that bind the 3' untranslated region of beta-F1-ATPase mRNA by adenine nucleotides and the redox state. *Arch Biochem Biophys* 433: 481-486.

**Izquierdo, JM, Jiménez, E, Cuezva, JM** (1995a). Hypothyroidism affects the expression of the beta-F1-ATPase gene and limits mitochondrial proliferation in rat liver at all stages of development. *Eur J Biochem* 232: 344-350.

**Izquierdo, JM, Luis, AM, Cuezva, JM** (1990). Postnatal mitochondrial differentiation in rat liver. Regulation by thyroid hormones of the beta-subunit of the mitochondrial F1-ATPase complex. *The Journal of biological chemistry* 265: 9090-9097.

**Izquierdo, JM, Ricart, J, Ostronoff, LK, Egea, G, Cuezva, JM** (1995b). Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *The Journal of biological chemistry* 270: 10342-10350.

**Janas, MM, Wang, E, Love, T, Harris, AS, Stevenson, K, Semmelmann, K, Shaffer, JM, Chen, PH, Doench, JG, Yerramilli, SV, Neuberg, DS, Iliopoulos, D, Housman, DE, Burge, CB, Novina, CD** (2012). Reduced expression of ribosomal proteins relieves microRNA-mediated repression. *Molecular cell* 46: 171-186.

**Janes, MR, Limon, JJ, So, L, Chen, J, Lim, RJ, Chavez, MA, Vu, C, Lilly, MB, Mallya, S, Ong, ST, Konopleva, M, Martin, MB, Ren, P, Liu, Y, Rommel, C, Fruman, DA** (2010). Effective and selective targeting of leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor. *Nature medicine* 16: 205-213.

**Jeninga, EH, Schoonjans, K, Auwerx, J** (2010). Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. *Oncogene* 29: 4617-4624.

- Jenkins, ZA, Haag, PG, Johansson, HE** (2001). Human eIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression. *Genomics* 71: 101-109.
- Jeon, SM, Chandel, NS, Hay, N** (2012). AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* 485: 661-665.
- Jin, HO, Hong, SE, Woo, SH, Lee, JH, Choe, TB, Kim, EK, Noh, WC, Lee, JK, Hong, SI, Kim, JI, Park, IC** (2012). Silencing of Twist1 sensitizes NSCLC cells to cisplatin via AMPK-activated mTOR inhibition. *Cell death & disease* 3: e319.
- Johnson, LF, Levis, R, Abelson, HT, Green, H, Penman, S** (1976). Changes in RNA in relation to growth of the fibroblast. IV. Alterations in the production and processing of mRNA and rRNA in resting and growing cells. *J Cell Biol* 71: 933-938.
- Johnson, RF, Perkins, ND** (2012). Nuclear factor-kappaB, p53, and mitochondria: regulation of cellular metabolism and the Warburg effect. *Trends Biochem Sci* 37: 317-324.
- Kaelin, WG, Jr., Ratcliffe, PJ** (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell* 30: 393-402.
- Kahn, BB, Alquier, T, Carling, D, Hardie, DG** (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell metabolism* 1: 15-25.
- Kahvejian, A, Svitkin, YV, Sukarieh, R, M'Boutchou, MN, Sonenberg, N** (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & development* 19: 104-113.
- Kemper, WM, Berry, KW, Merrick, WC** (1976). Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta. *The Journal of biological chemistry* 251: 5551-5557.
- Keunen, O, Johansson, M, Oudin, A, Sanzey, M, Rahim, SA, Fack, F, Thorsen, F, Taxt, T, Bartos, M, Jirik, R, Miletic, H, Wang, J, Stieber, D, Stuhr, L, Moen, I, Rygh, CB, Bjerkvig, R, Niclou, SP** (2011). Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 3749-3754.
- Kim, HS, Hwang, JT, Yun, H, Chi, SG, Lee, SJ, Kang, I, Yoon, KS, Choe, WJ, Kim, SS, Ha, J** (2008). Inhibition of AMP-activated protein kinase sensitizes cancer cells to cisplatin-induced apoptosis via hyper-induction of p53. *The Journal of biological chemistry* 283: 3731-3742.
- Kim, HS, Patel, K, Muldoon-Jacobs, K, Bisht, KS, Aykin-Burns, N, Pennington, JD, van der Meer, R, Nguyen, P, Savage, J, Owens, KM, Vassilopoulos, A, Ozden, O, Park, SH, Singh, KK, Abdulkadir, SA, Spitz, DR, Deng, CX, Gius, D** (2010). SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial

integrity and metabolism during stress. *Cancer cell* 17: 41-52.

**Kim, JW, Gao, P, Liu, YC, Semenza, GL, Dang, CV** (2007). Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol* 27: 7381-7393.

**King, A, Selak, MA, Gottlieb, E** (2006). Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* 25: 4675-4682.

**Koppen, M, Langer, T** (2007). Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 42: 221-242.

**Koritzinsky, M, Magagnin, MG, van den Beucken, T, Seigneuric, R, Savelkoul, K, Dostie, J, Pyronnet, S, Kaufman, RJ, Weppler, SA, Voncken, JW, Lambin, P, Koumenis, C, Sonenberg, N, Wouters, BG** (2006). Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control. *The EMBO journal* 25: 1114-1125.

**Koromilas, AE, Lazaris-Karatzas, A, Sonenberg, N** (1992a). mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *The EMBO journal* 11: 4153-4158.

**Koromilas, AE, Roy, S, Barber, GN, Katze, MG, Sonenberg, N** (1992b). Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. *Science* 257: 1685-1689.

**Kostova, Z, Wolf, DH** (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *The EMBO journal* 22: 2309-2317.

**Kozak, M** (1989). The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 108: 229-241.

**Kroemer, G, Pouyssegur, J** (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell* 13: 472-482.

**Krol, J, Loedige, I, Filipowicz, W** (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews* 11: 597-610.

**Kulawiec, M, Arnouk, H, Desouki, MM, Kazim, L, Still, I, Singh, KK** (2006). Proteomic analysis of mitochondria-to-nucleus retrograde response in human cancer. *Cancer biology & therapy* 5: 967-975.

**Kunz, WS** (2003). Different metabolic properties of mitochondrial oxidative phosphorylation in different cell types--important implications for mitochondrial cytopathies. *Experimental physiology* 88: 149-154.

**Lagouge, M, Argmann, C, Gerhart-Hines, Z, Meziane, H, Lerin, C, Daussin, F,**

Messadeq, N, Milne, J, Lambert, P, Elliott, P, Geny, B, Laakso, M, Puigserver, P, Auwerx, J (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127: 1109-1122.

Langer, T (2000). AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem Sci* 25: 247-251.

Larsson, O, Li, S, Issaenko, OA, Avdulov, S, Peterson, M, Smith, K, Bitterman, PB, Polunovsky, VA (2007). Eukaryotic translation initiation factor 4E induced progression of primary human mammary epithelial cells along the cancer pathway is associated with targeted translational deregulation of oncogenic drivers and inhibitors. *Cancer research* 67: 6814-6824.

Lee, J, Kim, CH, Simon, DK, Aminova, LR, Andreyev, AY, Kushnareva, YE, Murphy, AN, Lonze, BE, Kim, KS, Ginty, DD, Ferrante, RJ, Ryu, H, Ratan, RR (2005). Mitochondrial cyclic AMP response element-binding protein (CREB) mediates mitochondrial gene expression and neuronal survival. *The Journal of biological chemistry* 280: 40398-40401.

Lee, JH, Pestova, TV, Shin, BS, Cao, C, Choi, SK, Dever, TE (2002). Initiation factor eIF5B catalyzes second GTP-dependent step in eukaryotic translation initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 16689-16694.

Lee, NP, Tsang, FH, Shek, FH, Mao, M, Dai, H, Zhang, C, Dong, S, Guan, XY, Poon, RT, Luk, JM (2010). Prognostic significance and therapeutic potential of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 127: 968-976.

Lenaz, G, Genova, ML (2007). Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *American journal of physiology* 292: C1221-1239.

Lewis, BP, Burge, CB, Bartel, DP (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15-20.

Li, RJ, Zhang, GS, Chen, YH, Zhu, JF, Lu, QJ, Gong, FJ, Kuang, WY (2010a). Down-regulation of mitochondrial ATPase by hypermethylation mechanism in chronic myeloid leukemia is associated with multidrug resistance. *Ann Oncol* 7: 1506-1514.

Li, X, Zhang, Y, Zhang, Y, Ding, J, Wu, K, Fan, D (2010b). Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature. *Gut* 59: 579-585.

Lin, PC, Lin, JK, Yang, SH, Wang, HS, Li, AF, Chang, SC (2008). Expression of beta-F1-ATPase and mitochondrial transcription factor A and the change in mitochondrial DNA content in colorectal cancer: clinical data analysis and evidence from an in vitro study. *Int J Colorectal Dis* 23: 1223-1232.

Lithgow, T, Cuezva, JM, Silver, PA (1997). Highways for protein delivery to the

mitochondria. *Trends Biochem Sci* 22: 110-113.

**Liu, L, Cash, TP, Jones, RG, Keith, B, Thompson, CB, Simon, MC** (2006). Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Molecular cell* 21: 521-531.

**Liu, X, Wang, X, Zhang, J, Lam, EK, Shin, VY, Cheng, AS, Yu, J, Chan, FK, Sung, JJ, Jin, HC** (2010). Warburg effect revisited: an epigenetic link between glycolysis and gastric carcinogenesis. *Oncogene* 29: 442-450.

**Livak, KJ, Schmittgen, TD** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.

**Locasale, JW, Cantley, L. C, Vander Heiden, M. G.** (2009). Cancer's insatiable appetite. *Nat Biotechnol* 27: 916-917.

**Lopez-Rios, F, Sanchez-Arago, M, Garcia-Garcia, E, Ortega, AD, Berrendero, JR, Pozo-Rodriguez, F, Lopez-Encuentra, A, Ballestin, C, Cuezva, JM** (2007). Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer research* 67: 9013-9017.

**Lu, J, Getz, G, Miska, EA, Alvarez-Saavedra, E, Lamb, J, Peck, D, Sweet-Cordero, A, Ebert, BL, Mak, RH, Ferrando, AA, Downing, JR, Jacks, T, Horvitz, HR, Golub, TR** (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834-838.

**Luis, AM, Izquierdo, JM, Ostronoff, LK, Salinas, M, Santaren, JF, Cuezva, JM** (1993). Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver. Specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial beta-F1-ATPase mRNA. *The Journal of biological chemistry* 268: 1868-1875.

**Lytle, JR, Yario, TA, Steitz, JA** (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 9667-9672.

**Ma, L, Reinhardt, F, Pan, E, Soutschek, J, Bhat, B, Marcusson, EG, Teruya-Feldstein, J, Bell, GW, Weinberg, RA** (2010). Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nature biotechnology* 28: 341-347.

**Ma, L, Weinberg, RA** (2008). Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet* 24: 448-456.

**Ma, XM, Blenis, J** (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 307-318.

**Major, T, von Janowsky, B, Ruppert, T, Mogk, A, Voos, W** (2006). Proteomic analysis of mitochondrial protein turnover: identification of novel substrate proteins of the matrix protease pim1. *Mol Cell Biol* 26: 762-776.

**Mamane, Y, Petroulakis, E, Martineau, Y, Sato, TA, Larsson, O, Rajasekhar, VK,**

- Sonenberg, N** (2007). Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS One* 2: e242.
- Mansfield, KD, Guzy, RD, Pan, Y, Young, RM, Cash, TP, Schumacker, PT, Simon, MC** (2005). Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- $\alpha$  activation. *Cell metabolism* 1: 393-399.
- Marc, P, Margeot, A, Devaux, F, Blugeon, C, Corral-Debrinski, M, Jacq, C** (2002). Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO reports* 3: 159-164.
- Marchenko, ND, Wolff, S, Erster, S, Becker, K, Moll, UM** (2007). Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *The EMBO journal* 26: 923-934.
- Marchetti, A, Buttitta, F, Pellegrini, S, Bertacca, G, Callahan, R** (2001). Reduced expression of INT-6/eIF3-p48 in human tumors. *International journal of oncology* 18: 175-179.
- Margeot, A, Blugeon, C, Sylvestre, J, Vialette, S, Jacq, C, Corral-Debrinski, M** (2002). In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *The EMBO journal* 21: 6893-6904.
- Margeot, A, Garcia, M, Wang, W, Tetaud, E, di Rago, JP, Jacq, C** (2005). Why are many mRNAs translated to the vicinity of mitochondria: a role in protein complex assembly? *Gene* 354: 64-71.
- Martin, KC, Ephrussi, A** (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* 136: 719-730.
- Martinez-Diez, M, Santamaria, G, Ortega, AD, Cuezva, JM** (2006). Biogenesis and Dynamics of Mitochondria during the Cell Cycle: Significance of 3'UTRs. *PLoS ONE* 1: e107.
- Matoba, S, Kang, JG, Patino, WD, Wragg, A, Boehm, M, Gavrilova, O, Hurley, PJ, Bunz, F, Hwang, PM** (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312: 1650-1653.
- Mendoza, EE, Poceschi, MG, Kong, X, Leeper, DB, Caro, J, Limesand, KH, Burd, R** (2012). Control of Glycolytic Flux by AMP-Activated Protein Kinase in Tumor Cells Adapted to Low pH. *Transl Oncol* 5: 208-216.
- Mihaylova, MM, Shaw, RJ** (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* 13: 1016-1023.
- Miluzio, A, Beugnet, A, Volta, V, Biffo, S** (2009). Eukaryotic initiation factor 6 mediates a continuum between 60S ribosome biogenesis and translation. *EMBO reports* 10: 459-465.
- Moran, M, Moreno-Lastres, D, Marin-Buera, L, Arenas, J, Martin, MA, Ugalde, C** (2012). Mitochondrial respiratory chain dysfunction: Implications in neurodegeneration.

*Free Radic Biol Med* 53: 595-609.

**Morgan, MJ, Liu, ZG** (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell research* 21: 103-115.

**Morrish, F, Neretti, N, Sedivy, JM, Hockenbery, DM** (2008). The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry. *Cell Cycle* 7: 1054-1066.

**Mounir, Z, Krishnamoorthy, JL, Robertson, GP, Scheuner, D, Kaufman, RJ, Georgescu, MM, Koromilas, AE** (2009). Tumor suppression by PTEN requires the activation of the PKR-eIF2alpha phosphorylation pathway. *Science signaling* 2: ra85.

**Nakamura, JL, Garcia, E, Pieper, RO** (2008). S6K1 plays a key role in glial transformation. *Cancer research* 68: 6516-6523.

**Naya, FJ, Black, BL, Wu, H, Bassel-Duby, R, Richardson, JA, Hill, JA, Olson, EN** (2002). Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. *Nature medicine* 8: 1303-1309.

**Neckelmann, N, Warner, CK, Chung, A, Kudoh, J, Minoshima, S, Fukuyama, R, Maekawa, M, Shimizu, Y, Shimizu, N, Liu, JD, et al** (1989). The human ATP synthase beta subunit gene: sequence analysis, chromosome assignment, and differential expression. *Genomics* 5: 829-843.

**Nikitin, A, Egorov, S, Daraselia, N, Mazo, I** (2003). Pathway studio--the analysis and navigation of molecular networks. *Bioinformatics* 19: 2155-2157.

**Nogales-Cadenas, R, Carmona-Saez, P, Vazquez, M, Vicente, C, Yang, X, Tirado, F, Carazo, JM, Pascual-Montano, A** (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res* 37: W317-322.

**Novichkova, S, Egorov, S, Daraselia, N** (2003). MedScan, a natural language processing engine for MEDLINE abstracts. *Bioinformatics* 19: 1699-1706.

**Nupponen, NN, Porkka, K, Kakkola, L, Tanner, M, Persson, K, Borg, A, Isola, J, Visakorpi, T** (1999). Amplification and overexpression of p40 subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 in breast and prostate cancer. *Am J Pathol* 154: 1777-1783.

**Orom, UA, Nielsen, FC, Lund, AH** (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular cell* 30: 460-471.

**Ortega, AD, Cuezva, JM** (2004). The organelles I: Mitochondrial failure and neurodegeneration. en *Brain damage and repair*, (Ed. Herdegen, T, Delgado-García, JM). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p. pp. 95-109.

**Ortega, AD, Sala, S, Espinosa, E, Gonzalez-Baron, M, Cuezva, JM** (2008). HuR and

the bioenergetic signature of breast cancer: a low tumor expression of the RNA-binding protein predicts a higher risk of disease recurrence. *Carcinogenesis* 29: 2053-2061.

**Ortega, AD, Willers, IM, Sala, S, Cuezva, JM** (2010). Human G3BP1 interacts with beta-F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *J Cell Sci* 123: 2685-2696.

**Osthus, RC, Shim, H, Kim, S, Li, Q, Reddy, R, Mukherjee, M, Xu, Y, Wonsey, D, Lee, LA, Dang, CV** (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *The Journal of biological chemistry* 275: 21797-21800.

**Ostronoff, LK, Izquierdo, JM, Cuezva, JM** (1995). mt-mRNA stability regulates the expression of the mitochondrial genome during liver development. *Biochemical and biophysical research communications* 217: 1094-1098.

**Ostronoff, LK, Izquierdo, JM, Enriquez, JA, Montoya, J, Cuezva, JM** (1996a). Transient activation of mitochondrial translation regulates the expression of the mitochondrial genome during mammalian mitochondrial differentiation. *Biochem J* 316 (Pt 1): 183-191.

**Ostronoff, LK, Izquierdo, JM, Enríquez, JA, Montoya, J, Cuezva, JM** (1996b). Transient activation of mitochondrial translation regulates the expression of the mitochondrial genome during mammalian mitochondrial differentiation. *Biochem J* 316: 183-191.

**Ouchi, N, Shibata, R, Walsh, K** (2005). AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle. *Circ Res* 96: 838-846.

**Pagliarini, DJ, Calvo, SE, Chang, B, Sheth, SA, Vafai, SB, Ong, SE, Walford, GA, Sugiana, C, Boneh, A, Chen, WK, Hill, DE, Vidal, M, Evans, JG, Thorburn, DR, Carr, SA, Mootha, VK** (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134: 112-123.

**Pan, Y, Mansfield, KD, Bertozzi, CC, Rudenko, V, Chan, DA, Giaccia, AJ, Simon, MC** (2007). Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 27: 912-925.

**Paumard, P, Vaillier, J, Couлары, B, Schaeffer, J, Soubannier, V, Mueller, DM, Brethes, D, di Rago, JP, Velours, J** (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *The EMBO journal* 21: 221-230.

**Pelicano, H, Xu, RH, Du, M, Feng, L, Sasaki, R, Carew, JS, Hu, Y, Ramdas, L, Hu, L, Keating, MJ, Zhang, W, Plunkett, W, Huang, P** (2006). Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J Cell Biol* 175: 913-923.

**Pestova, TV, Lomakin, IB, Lee, JH, Choi, SK, Dever, TE, Hellen, CU** (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403: 332-335.

**Plas, DR, Thompson, CB** (2005). Akt-dependent transformation: there is more to growth



than just surviving. *Oncogene* 24: 7435-7442.

**Potthoff, MJ, Olson, EN** (2007). MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 134: 4131-4140.

**Puigserver, P** (2005). Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha. *International journal of obesity (2005)* 29 Suppl 1: S5-9.

**Pullman, ME, Monroy, GC** (1963). A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *The Journal of biological chemistry* 238: 3762-3769.

**Qin, W, Shi, Y, Zhao, B, Yao, C, Jin, L, Ma, J, Jin, Y** (2010). miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS One* 5: e9429.

**Ramanathan, A, Wang, C, Schreiber, SL** (2005). Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 5992-5997.

**Ricart, J, Egea, G, Izquierdo, JM, San Martin, C, Cuezva, JM** (1997). Subcellular structure containing mRNA for beta subunit of mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in rat hepatocytes is translationally active. *Biochem J* 324 ( Pt 2): 635-643.

**Ricart, J, Izquierdo, JM, Di Liegro, CM, Cuezva, JM** (2002). The assembly of the ribonucleoprotein complex containing the mRNA of the b-subunit of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase requires the participation of two distal cis-acting elements and a complex set of cellular trans-acting proteins. *Biochem J* 365: 417-428.

**Roberts, SB, Segil, N, Heintz, N** (1991). Differential phosphorylation of the transcription factor Oct1 during the cell cycle. *Science* 253: 1022-1026.

**Rodriguez, AJ, Czaplinski, K, Condeelis, JS, Singer, RH** (2008). Mechanisms and cellular roles of local protein synthesis in mammalian cells. *Current opinion in cell biology* 20: 144-149.

**Rogers, GW, Jr., Richter, NJ, Lima, WF, Merrick, WC** (2001). Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *The Journal of biological chemistry* 276: 30914-30922.

**Romero-Ruiz, A, Bautista, L, Navarro, V, Heras-Garvin, A, March-Diaz, R, Castellano, A, Gomez-Diaz, R, Castro, MJ, Berra, E, Lopez-Barneo, J, Pascual, A** (2012). Prolyl hydroxylase-dependent modulation of eukaryotic elongation factor 2 activity and protein translation under acute hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 287: 9651-9658.

**Rosenwald, IB, Rhoads, DB, Callanan, LD, Isselbacher, KJ, Schmidt, EV** (1993). Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 6175-6178.

- Rossignol, R, Malgat, M, Mazat, JP, Letellier, T** (1999). Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies. *The Journal of biological chemistry* 274: 33426-33432.
- Ruggero, D, Pandolfi, PP** (2003). Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 3: 179-192.
- Saini, P, Eyler, DE, Green, R, Dever, TE** (2009). Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* 459: 118-121.
- Saint-Georges, Y, Garcia, M, Delaveau, T, Jourden, L, Le Crom, S, Lemoine, S, Tanty, V, Devaux, F, Jacq, C** (2008). Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PLoS One* 3: e2293.
- Sambrook, J, Russell, DW** (2001). Molecular cloning. A Laboratory manual, 3rd edn (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanchez-Arago, M, Cuezva, JM** (2011). The bioenergetic signature of isogenic colon cancer cells predicts the cell death response to treatment with 3-bromopyruvate, iodoacetate or 5-fluorouracil. *J Transl Med* 9: 19.
- Sanchez-Arago, M, Chamorro, M, Cuezva, JM** (2010). Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis* 31: 567-576.
- Sanchez-Arago, M, Formentini, L, Cuezva, JM** (2012). Mitochondria-mediated energy adaptation in cancer: The H<sup>+</sup>-ATP synthase-gear switch of metabolism in human tumors. *Antioxid Redox Signal*.
- Sanchez-Cenizo, L, Formentini, L, Aldea, M, Ortega, AD, Garcia-Huerta, P, Sanchez-Arago, M, Cuezva, JM** (2010). Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *The Journal of biological chemistry* 285: 25308-25313.
- Santamaria, G, Martinez-Diez, M, Fabregat, I, Cuezva, JM** (2006). Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase. *Carcinogenesis* 27: 925-935.
- Sarbassov, DD, Ali, SM, Sabatini, DM** (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Current opinion in cell biology* 17: 596-603.
- Satrústegui, J, Pardo, B, Del Arco, A** (2007). Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiological reviews* 87: 29-67.
- Scarpulla, RC** (2002). Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* 286: 81-89.
- Scarpulla, RC** (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological reviews* 88: 611-638.

**Scoles, DR, Yong, WH, Qin, Y, Wawrowsky, K, Pulst, SM** (2006). Schwannomin inhibits tumorigenesis through direct interaction with the eukaryotic initiation factor subunit c (eIF3c). *Human molecular genetics* 15: 1059-1070.

**Schetter, AJ, Leung, SY, Sohn, JJ, Zanetti, KA, Bowman, ED, Yanaihara, N, Yuen, ST, Chan, TL, Kwong, DL, Au, GK, Liu, CG, Calin, GA, Croce, CM, Harris, CC** (2008). MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *Jama* 299: 425-436.

**Schieke, SM, McCoy, JP, Jr., Finkel, T** (2008). Coordination of mitochondrial bioenergetics with G1 phase cell cycle progression. *Cell Cycle* 7: 1782-1787.

**Schieke, SM, Phillips, D, McCoy, JP, Jr., Aponte, AM, Shen, RF, Balaban, RS, Finkel, T** (2006). The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *The Journal of biological chemistry* 281: 27643-27652.

**Semenza, GL** (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29: 625-634.

**Semenza, GL** (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148: 399-408.

**Sempere, LF, Christensen, M, Silaharoglu, A, Bak, M, Heath, CV, Schwartz, G, Wells, W, Kauppinen, S, Cole, CN** (2007). Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer research* 67: 11612-11620.

**Shakya, A, Cooksey, R, Cox, JE, Wang, V, McClain, DA, Tantin, D** (2009). Oct1 loss of function induces a coordinate metabolic shift that opposes tumorigenicity. *Nat Cell Biol* 11: 320-327.

**She, H, Yang, Q, Shepherd, K, Smith, Y, Miller, G, Testa, C, Mao, Z** (2011). Direct regulation of complex I by mitochondrial MEF2D is disrupted in a mouse model of Parkinson disease and in human patients. *J Clin Invest* 121: 930-940.

**Sheffer, M, Bacolod, MD, Zuk, O, Giardina, SF, Pincas, H, Barany, F, Paty, PB, Gerald, WL, Notterman, DA, Domany, E** (2009). Association of survival and disease progression with chromosomal instability: a genomic exploration of colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 7131-7136.

**Shenoy, N, Kessel, R, Bhagat, T, Bhattacharya, S, Yu, Y, McMahon, C, Verma, A** (2012). Alterations in the ribosomal machinery in cancer and hematologic disorders. *Journal of hematology & oncology* 5: 32.

**Shi, J, Kahle, A, Hershey, JW, Honchak, BM, Warneke, JA, Leong, SP, Nelson, MA** (2006). Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells. *Oncogene* 25: 4923-4936.

**Shi, Y, Frost, PJ, Hoang, BQ, Benavides, A, Sharma, S, Gera, JF, Lichtenstein, AK** (2008). IL-6-induced stimulation of c-myc translation in multiple myeloma cells is mediated by myc internal ribosome entry site function and the RNA-binding protein, hnRNP A1. *Cancer research* 68: 10215-10222.

**Shin, BS, Maag, D, Roll-Mecak, A, Arefin, MS, Burley, SK, Lorsch, JR, Dever, TE** (2002). Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity. *Cell* 111: 1015-1025.

**Shin, YK, Yoo, BC, Chang, HJ, Jeon, E, Hong, SH, Jung, MS, Lim, SJ, Park, JG** (2005). Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer research* 65: 3162-3170.

**Shuda, M, Kondoh, N, Tanaka, K, Ryo, A, Wakatsuki, T, Hada, A, Goseki, N, Igari, T, Hatsuse, K, Aihara, T, Horiuchi, S, Shichita, M, Yamamoto, N, Yamamoto, M** (2000). Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 20: 2489-2494.

**Silvera, D, Formenti, SC, Schneider, RJ** (2010). Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* 10: 254-266.

**Silvera, D, Schneider, RJ** (2009). Inflammatory breast cancer cells are constitutively adapted to hypoxia. *Cell Cycle* 8: 3091-3096.

**Sonenberg, N, Hinnebusch, AG** (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136: 731-745.

**Sonoki, T, Iwanaga, E, Mitsuya, H, Asou, N** (2005). Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 19: 2009-2010.

**Spiegelman, BM** (2007). Transcriptional control of mitochondrial energy metabolism through the PGC1 coactivators. *Novartis Found Symp* 287: 60-63; discussion 63-69.

**Spremulli, LL, Coursey, A, Navratil, T, Hunter, SE** (2004). Initiation and elongation factors in mammalian mitochondrial protein biosynthesis. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 77: 211-261.

**Spriggs, KA, Cobbold, LC, Jopling, CL, Cooper, RE, Wilson, LA, Stoneley, M, Coldwell, MJ, Poncet, D, Shen, YC, Morley, SJ, Bushell, M, Willis, AE** (2009). Canonical initiation factor requirements of the Myc family of internal ribosome entry segments. *Mol Cell Biol* 29: 1565-1574.

**Srikantan, S, Gorospe, M** (2012). HuR function in disease. *Front Biosci* 17: 189-205.

**Stanyer, L, Jorgensen, W, Hori, O, Clark, JB, Heales, SJ** (2008). Inactivation of brain mitochondrial Lon protease by peroxynitrite precedes electron transport chain dysfunction. *Neurochem Int* 53: 95-101.

**Sudarshan, S, Sourbier, C, Kong, HS, Block, K, Valera Romero, VA, Yang, Y, Galindo, C, Mollapour, M, Scroggins, B, Goode, N, Lee, MJ, Gourlay, CW, Trepel, J, Linehan, WM, Neckers, L** (2009). Fumarate hydratase deficiency in renal cancer induces glycolytic addiction and hypoxia-inducible transcription factor 1alpha stabilization by glucose-dependent generation of reactive oxygen species. *Mol Cell Biol* 29: 4080-4090.

**Suen, DF, Norris, KL, Youle, RJ** (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & development* 22: 1577-1590.

**Sylvestre, J, Margeot, A, Jacq, C, Dujardin, G, Corral-Debrinski, M** (2003). The role of the 3' untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol Biol Cell* 14: 3848-3856.

**Szabadkai, G, Simoni, AM, Chami, M, Wieckowski, MR, Youle, RJ, Rizzuto, R** (2004). Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca<sup>2+</sup> waves and protects against Ca<sup>2+</sup>-mediated apoptosis. *Molecular cell* 16: 59-68.

**Szczepanek, K, Lesnfsky, EJ, Larner, AC** (2012). Multi-tasking: nuclear transcription factors with novel roles in the mitochondria. *Trends in cell biology*.

**Tang, D, Wu, D, Hirao, A, Lahti, JM, Liu, L, Mazza, B, Kidd, VJ, Mak, TW, Ingram, AJ** (2002). ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *The Journal of biological chemistry* 277: 12710-12717.

**Tejada, S, Lobo, MV, Garcia-Villanueva, M, Sacristan, S, Perez-Morgado, MI, Salinas, M, Martin, ME** (2009). Eukaryotic initiation factors (eIF) 2alpha and 4E expression, localization, and phosphorylation in brain tumors. *J Histochem Cytochem* 57: 503-512.

**Tennant, DA, Duran, RV, Gottlieb, E** (2010). Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 10: 267-277.

**Thoreen, CC, Chantranupong, L, Keys, HR, Wang, T, Gray, NS, Sabatini, DM** (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* 485: 109-113.

**Thoreen, CC, Kang, SA, Chang, JW, Liu, Q, Zhang, J, Gao, Y, Reichling, LJ, Sim, T, Sabatini, DM, Gray, NS** (2009). An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *The Journal of biological chemistry* 284: 8023-8032.

**Tourriere, H, Chebli, K, Zekri, L, Courselaud, B, Blanchard, JM, Bertrand, E, Tazi, J** (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* 160: 823-831.

**Tourriere, H, Gallouzi, IE, Chebli, K, Capony, JP, Mouaikel, J, van der Geer, P, Tazi, J** (2001). RasGAP-associated endoribonuclease G3BP: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol Cell Biol* 21: 7747-7760.

**Tu, BP, McKnight, SL** (2006). Metabolic cycles as an underlying basis of biological oscillations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 696-701.

**Uniacke, J, Holterman, CE, Lachance, G, Franovic, A, Jacob, MD, Fabian, MR, Payette, J, Holcik, M, Pause, A, Lee, S** (2012). An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* 486: 126-129.

**Valcarce, C, Navarrete, RM, Encabo, P, Loeches, E, Satrustegui, J, Cuezva, JM** (1988). Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *The Journal of biological chemistry* 263: 7767-7775.

**Van Dyck, L, Pearce, DA, Sherman, F** (1994). PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 269: 238-242.

**van Veelen, W, Korsse, SE, van de Laar, L, Peppelenbosch, MP** (2011). The long and winding road to rational treatment of cancer associated with LKB1/AMPK/TSC/mTORC1 signaling. *Oncogene* 30: 2289-2303.

**Vander Heiden, MG, Cantley, LC, Thompson, CB** (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029-1033.

**Vasudevan, S, Tong, Y, Steitz, JA** (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318: 1931-1934.

**Villar, M, Ortega-Perez, I, Were, F, Cano, E, Redondo, JM, Vazquez, J** (2006). Systematic characterization of phosphorylation sites in NFATc2 by linear ion trap mass spectrometry. *Proteomics* 6 Suppl 1: S16-27.

**Wallace, DC** (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39: 359-407.

**Wang, C, Li, Z, Lu, Y, Du, R, Katiyar, S, Yang, J, Fu, M, Leader, JE, Quong, A, Novikoff, PM, Pestell, RG** (2006). Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 11567-11572.

**Wang, H, Iakova, P, Wilde, M, Welm, A, Goode, T, Roesler, WJ, Timchenko, NA** (2001). C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Molecular cell* 8: 817-828.

**Wang, N, Gottesman, S, Willingham, MC, Gottesman, MM, Maurizi, MR** (1993). A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 11247-11251.

**Wang, W, Fan, J, Yang, X, Furer-Galban, S, Lopez de Silanes, I, von Kobbe, C, Guo, J, Georas, SN, Foufelle, F, Hardie, DG, Carling, D, Gorospe, M** (2002). AMP-activated

kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol Cell Biol* 22: 3425-3436.

**Wang, X, Martindale, JL, Holbrook, NJ** (2000). Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 275: 39435-39443.

**Wang, X, Moraes, CT** (2011). Increases in mitochondrial biogenesis impair carcinogenesis at multiple levels. *Molecular oncology* 5: 399-409.

**Warburg, O** (1930). Metabolism of tumors. In Arnold Constable (London ).

**Warburg, O** (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124: 269-270.

**Warburg, O** (1956b). On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-314.

**Wegrzyn, J, Potla, R, Chwae, YJ, Sepuri, NB, Zhang, Q, Koeck, T, Derecka, M, Szczepanek, K, Szelag, M, Gornicka, A, Moh, A, Moghaddas, S, Chen, Q, Bobbili, S, Cichy, J, Dulak, J, Baker, DP, Wolfman, A, Stuehr, D, Hassan, MO, Fu, XY, Avadhani, N, Drake, JI, Fawcett, P, Lesnefsky, EJ, Larner, AC** (2009). Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* 323: 793-797.

**Wek, RC, Jiang, HY, Anthony, TG** (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 34: 7-11.

**Westermann, B** (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 872-884.

**Wickens, M, Bernstein, DS, Kimble, J, Parker, R** (2002). A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet* 18: 150-157.

**Willers, IM, Cuezva, JM** (2011). Post-transcriptional regulation of the mitochondrial H(+)-ATP synthase: A key regulator of the metabolic phenotype in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1807: 543-551.

**Willers, IM, Isidoro, A, Ortega, AD, Fernandez, PL, Cuezva, JM** (2010). Selective inhibition of beta-F1-ATPase mRNA translation in human tumours. *Biochem J* 426: 319-326.

**Willers, IM, Martínez-Reyes, I, Martínez-Diez, M, Cuezva, J** (2012). miR-127-5p targets the 3'UTR of human  $\beta$ -F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics* 1817: 838-848.

**Wittig, I, Schagger, H** (2009). Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1787: 672-680.

**Wu, X, Senechal, K, Neshat, MS, Whang, YE, Sawyers, CL** (1998). The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 15587-15591.

**Ye, J, Kumanova, M, Hart, LS, Sloane, K, Zhang, H, De Panis, DN, Bobrovnikova-Marjon, E, Diehl, JA, Ron, D, Koumenis, C** (2010). The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *The EMBO journal* 29: 2082-2096.

**Yen, PM** (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews* 81: 1097-1142.

**Yoshida, M, Muneyuki, E, Hisabori, T** (2001). ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 669-677.

**Youle, RJ, Narendra, DP** (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 9-14.

**Yun, H, Lee, M, Kim, SS, Ha, J** (2005). Glucose deprivation increases mRNA stability of vascular endothelial growth factor through activation of AMP-activated protein kinase in DU145 prostate carcinoma. *The Journal of biological chemistry* 280: 9963-9972.

**Zeng, YX, Somasundaram, K, el-Deiry, WS** (1997). AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF1/CIP1 expression. *Nat Genet* 15: 78-82.

**Zerbes, RM, Bohnert, M, Stroud, DA, von der Malsburg, K, Kram, A, Oeljeklaus, S, Warscheid, B, Becker, T, Wiedemann, N, Veenhuis, M, van der Klei, IJ, Pfanner, N, van der Laan, M** (2012). Role of MINOS in Mitochondrial Membrane Architecture: Cristae Morphology and Outer Membrane Interactions Differentially Depend on Mitofilin Domains. *J Mol Biol* 422: 183-191.

**Zetterberg, A, Larsson, O, Wiman, KG** (1995). What is the restriction point? *Current opinion in cell biology* 7: 835-842.

**Zhang, C, Lin, M, Wu, R, Wang, X, Yang, B, Levine, AJ, Hu, W, Feng, Z** (2011). Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 16259-16264.

**Zhang, H, Gao, P, Fukuda, R, Kumar, G, Krishnamachary, B, Zeller, KI, Dang, CV, Semenza, GL** (2007a). HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer cell* 11: 407-420.

**Zhang, HZ, Liu, JG, Wei, YP, Wu, C, Cao, YK, Wang, M** (2007b). Expression of G3BP and RhoC in esophageal squamous carcinoma and their effect on prognosis. *World J Gastroenterol* 13: 4126-4130.

**Zhang, L, Pan, X, Hershey, JW** (2007c). Individual overexpression of five subunits of human translation initiation factor eIF3 promotes malignant transformation of immortal fibroblast cells. *The Journal of biological chemistry* 282: 5790-5800.



**Zhou, X, Tan, M, Stone Hawthorne, V, Klos, KS, Lan, KH, Yang, Y, Yang, W, Smith, TL, Shi, D, Yu, D** (2004). Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin Cancer Res* 10: 6779-6788.

# ***ANEXO I***



**Material suplementario A1:** Lista de los 62 genes analizados en GeneCodis, que son diana de los distintos factores de transcripción significativamente activados o reprimidos en las células con fenotipo G y cuyo valor de cambio es igual o superior a 1.5.

AP2	Gen	Valor de cambio (G vs. M)	p-valor
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	2,25	0,000
TGFA	transforming growth factor, alpha	2,09	0,000
EGFR	epidermal growth factor receptor	1,71	0,000
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1,59	0,000
SP1	Sp1 transcription factor	-1,69	0,004
RAD51	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)	-1,80	0,001
ADM	adrenomedullin	-3,00	0,000

CEBP	Gen	Valor de cambio (G vs. M)	p-valor
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E	8,26	6E-05
LCN2	lipocalin 2	7,47	1E-07
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	5,34	2E-06
ASNS	asparagine synthetase	4,44	7E-06
PCK2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	4,32	1E-04
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	2,43	6E-05
HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	2,37	2E-04
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	2,25	4E-04
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	1,73	1E-03
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1,59	4E-04
TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	1,54	1E-03
ATF3	activating transcription factor 3	1,53	2E-02
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	-1,58	3E-03
SP1	Sp1 transcription factor	-1,69	4E-03
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	-1,73	5E-04
DHFR	dihydrofolate reductase	-1,84	3E-03
HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A /// heat shock 70kDa protein 1B	-2,36	7E-05
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-7,84	5E-06

OCT	Gen	Valor de cambio (G vs. M)	p-valor
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	2,43	0,00
SDC4	syndecan 4	2,08	0,00
TK1	thymidine kinase 1, soluble	-1,59	0,00

p53	Gen	Valor de cambio (G vs. M)	p-valor
UPP1	uridine phosphorylase 1	8,62	7E-07
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E	8,26	6E-05
PLAU	plasminogen activator, urokinase	5,76	9E-06
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	5,34	2E-06
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	2,43	6E-05
HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	2,37	2E-04
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	2,25	4E-04
TGFA	transforming growth factor, alpha	2,09	2E-04
PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	1,96	4E-04
TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	1,92	4E-04
CLIC4	chloride intracellular channel 4	1,80	7E-05
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	1,73	1E-03
EGFR	epidermal growth factor receptor	1,71	4E-04
BCL2L1	BCL2-like 1	1,60	8E-03
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1,59	4E-04

CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	1,58	9E-03
FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	1,56	2E-02
TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	1,54	1E-03
ATF3	activating transcription factor 3	1,53	2E-02
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	-1,51	6E-04
MYBL2	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	-1,56	5E-05
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	-1,58	3E-03
SP1	Sp1 transcription factor	-1,69	4E-03
CCND3	cyclin D3	-1,69	4E-04
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	-1,73	5E-04
RAD51	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)	-1,80	5E-04
MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	-1,83	6E-04
DHFR	dihydrofolate reductase	-1,84	3E-03
HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A /// heat shock 70kDa protein 1B	-2,36	7E-05
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	-2,41	1E-03
FN1	fibronectin 1	-3,90	3E-03
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-7,84	5E-06

SP1	Gen	Valor de cambio (G vs. M)	p-valor
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E	8,26	6E-05
PLAU	plasminogen activator, urokinase	5,76	9E-06
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	5,34	2E-06
ASNS	asparagine synthetase	4,44	7E-06
FOSL1	FOS-like antigen 1	3,31	1E-04
HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	2,37	2E-04
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	2,25	4E-04
TGFA	transforming growth factor, alpha	2,09	2E-04
SDC4	syndecan 4	2,08	6E-05
MB	myoglobin	2,01	5E-03
PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	1,96	4E-04
TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	1,92	4E-04
CLIC4	chloride intracellular channel 4	1,80	7E-05
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	1,73	1E-03
EGFR	epidermal growth factor receptor	1,71	4E-04
BCL2L1	BCL2-like 1	1,60	8E-03
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1,59	4E-04
FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	1,56	2E-02
TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	1,54	1E-03
PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	1,51	2E-02
KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)	1,50	1E-02
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	-1,51	6E-04
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	-1,52	3E-02
HHEX	hematopoietically expressed homeobox	-1,52	5E-02
MYBL2	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	-1,56	5E-05
HHEX	hematopoietically expressed homeobox	-1,61	2E-03
UCP2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	-1,65	4E-03
NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	-1,67	3E-02
SP1	Sp1 transcription factor	-1,69	4E-03
CCND3	cyclin D3	-1,69	4E-04
ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	-1,72	6E-03
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	-1,73	5E-04
TFAM	transcription factor A, mitochondrial	-1,79	2E-02

NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	-1,80	3E-02
MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	-1,83	6E-04
DHFR	dihydrofolate reductase	-1,84	3E-03
HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	-1,98	4E-04
EGR1	early growth response 1	-2,28	2E-03
HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A /// heat shock 70kDa protein 1B	-2,36	7E-05
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	-2,50	2E-04
ADM	adrenomedullin	-3,00	3E-04
PLA2G4A	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	-3,37	3E-03
FN1	fibronectin 1	-3,90	3E-03
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-7,84	5E-06

<b>STAT3</b>	<b>Gen</b>	<b>Valor de cambio (G vs. M)</b>	<b>p-valor</b>
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E	8,26	0,00
LCN2	lipocalin 2	7,47	0,00
PCK2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	4,32	0,00
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	2,25	0,00
PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	1,96	0,00
ALAS1	aminolevulinate, delta-, synthase 1	1,73	0,00
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	1,73	0,00
EGFR	epidermal growth factor receptor	1,71	0,00
BCL2L1	BCL2-like 1	1,60	0,01
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1,59	0,00
FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	1,56	0,02
TK1	thymidine kinase 1, soluble	-1,59	0,00
SP1	Sp1 transcription factor	-1,69	0,00
ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	-1,72	0,01
PRF1	perforin 1 (pore forming protein)	-1,76	0,00
HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	-1,98	0,00
HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A /// heat shock 70kDa protein 1B	-2,36	0,00
PLA2G4A	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	-3,37	0,00
FN1	fibronectin 1	-3,90	0,00
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-7,84	0,00

<b>TR</b>	<b>Gen</b>	<b>Valor de cambio (G vs. M)</b>	<b>p-valor</b>
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	2,25	0,00
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	-1,58	0,00

<b>MEF2</b>	<b>Gen</b>	<b>Valor de cambio (G vs. M)</b>	<b>p-valor</b>
MB	myoglobin	2,01	0,00
ATF3	activating transcription factor 3	1,53	0,02
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	-1,52	0,03
NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	-1,67	0,03
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-7,84	0,00



## ***ANEXO II***





**Material suplementario A2:** Lista de publicaciones indicadas en la tabla 2 que hacen referencia a las modificaciones en los niveles de expresión de los factores de iniciación de la traducción y sus reguladores en distintos tipos de cáncer.

1. Rosenwald, I.B., et al., *Expression of translation initiation factor eIF-2alpha is increased in benign and malignant melanocytic and colonic epithelial neoplasms.* Cancer, 2003. **98**(5): p. 1080-8.
2. Wang, S., et al., *Expression of eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha correlates with the progression of thyroid carcinoma.* Thyroid, 2001. **11**(12): p. 1101-7.
3. Tejada, S., et al., *Eukaryotic initiation factors (eIF) 2alpha and 4E expression, localization, and phosphorylation in brain tumors.* J Histochem Cytochem, 2009. **57**(5): p. 503-12.
4. Wang, S., et al., *Expression of the eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha in non-Hodgkin's lymphomas.* Am J Pathol, 1999. **155**(1): p. 247-55.
5. Rosenwald, I.B., et al., *Expression of the translation initiation factors eIF-4E and eIF-2\* is frequently increased in neoplastic cells of Hodgkin lymphoma.* Hum Pathol, 2008. **39**(6): p. 910-6.
6. Bachmann, F., R. Banziger, and M.M. Burger, *Cloning of a novel protein overexpressed in human mammary carcinoma.* Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 988-94.
7. Dellas, A., et al., *Expression of p150 in cervical neoplasia and its potential value in predicting survival.* Cancer, 1998. **83**(7): p. 1376-83.
8. Pincheira, R., Q. Chen, and J.T. Zhang, *Identification of a 170-kDa protein overexpressed in lung cancers.* Br J Cancer, 2001. **84**(11): p. 1520-7.
9. Chen, G. and M.M. Burger, *p150 expression and its prognostic value in squamous-cell carcinoma of the esophagus.* Int J Cancer, 1999. **84**(2): p. 95-100.
10. Chen, G. and M.M. Burger, *p150 overexpression in gastric carcinoma: the association with p53, apoptosis and cell proliferation.* Int J Cancer, 2004. **112**(3): p. 393-8.
11. Rothe, M., et al., *Eukaryotic initiation factor 3 p110 mRNA is overexpressed in testicular seminomas.* Am J Pathol, 2000. **157**(5): p. 1597-604.
12. Scoles, D.R., et al., *Schwannomin inhibits tumorigenesis through direct interaction with the eukaryotic initiation factor subunit c (eIF3c).* Hum Mol Genet, 2006. **15**(7): p. 1059-70.
13. Saramaki, O., et al., *Amplification of EIF3S3 gene is associated with advanced stage in prostate cancer.* Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2089-94.
14. Shi, J., et al., *Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells.* Oncogene, 2006. **25**(35): p. 4923-36.
15. Marchetti, A., et al., *Reduced expression of INT-6/eIF3-p48 in human tumors.* Int J Oncol, 2001. **18**(1): p. 175-9.
16. Buttitta, F., et al., *Int6 expression can predict survival in early-stage non-small cell lung cancer patients.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(9): p. 3198-204.
17. Umar, A., et al., *Identification of a putative protein profile associated with tamoxifen therapy resistance in breast cancer.* Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(6): p. 1278-94.
18. Grzmil, M., et al., *An oncogenic role of eIF3e/INT6 in human breast cancer.* Oncogene, 2010. **29**(28): p. 4080-9.

19. Anderson, K.S., et al., *Protein microarray signature of autoantibody biomarkers for the early detection of breast cancer*. J Proteome Res, 2011. **10**(1): p. 85-96.
20. Lee, N.P., et al., *Prognostic significance and therapeutic potential of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer, 2010. **127**(4): p. 968-76.
21. Guan, X.Y., et al., *Oncogenic role of eIF-5A2 in the development of ovarian cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(12): p. 4197-200.
22. Guan, X.Y., et al., *Isolation of a novel candidate oncogene within a frequently amplified region at 3q26 in ovarian cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3806-9.
23. Xie, D., et al., *Overexpression of EIF-5A2 is associated with metastasis of human colorectal carcinoma*. Hum Pathol, 2008. **39**(1): p. 80-6.
24. Luo, J.H., et al., *Overexpression of EIF-5A2 predicts tumor recurrence and progression in pTa/pT1 urothelial carcinoma of the bladder*. Cancer Sci, 2009. **100**(5): p. 896-902.
25. Chen, W., et al., *Overexpression of EIF-5A2 is an independent predictor of outcome in patients of urothelial carcinoma of the bladder treated with radical cystectomy*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(2): p. 400-8.
26. Sanvito, F., et al., *Expression of a highly conserved protein, p27BBP, during the progression of human colorectal cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(3): p. 510-6.
27. Rosso, P., et al., *Overexpression of p27BBP in head and neck carcinomas and their lymph node metastases*. Head Neck, 2004. **26**(5): p. 408-17.
28. Flavin, R.J., et al., *Altered eIF6 and Dicer expression is associated with clinicopathological features in ovarian serous carcinoma patients*. Mod Pathol, 2008. **21**(6): p. 676-84.
29. Coleman, L.J., et al., *Combined analysis of eIF4E and 4E-binding protein expression predicts breast cancer survival and estimates eIF4E activity*. Br J Cancer, 2009. **100**(9): p. 1393-9.
30. De Benedetti, A. and J.R. Graff, *eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases*. Oncogene, 2004. **23**(18): p. 3189-99.
31. Thumma, S.C. and R.A. Kratzke, *Translational control: a target for cancer therapy*. Cancer Lett, 2007. **258**(1): p. 1-8.
32. Wang, R., et al., *Overexpression of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and its clinical significance in lung adenocarcinoma*. Lung Cancer, 2009. **66**(2): p. 237-44.
33. Graff, J.R., et al., *eIF4E activation is commonly elevated in advanced human prostate cancers and significantly related to reduced patient survival*. Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 3866-73.
34. Salehi, Z. and F. Mashayekhi, *Expression of the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) and 4E-BP1 in esophageal cancer*. Clin Biochem, 2006. **39**(4): p. 404-9.
35. Wang, X.L., et al., *Detection of eukaryotic translation initiation factor 4E and its clinical significance in hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(20): p. 2540-4.
36. Furic, L., et al., *eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(32): p. 14134-9.
37. Wendel, H.G., et al., *Dissecting eIF4E action in tumorigenesis*. Genes Dev, 2007. **21**(24): p. 3232-7.
38. Noske, A., et al., *Activation of mTOR in a subgroup of ovarian carcinomas: correlation with p-eIF-4E and prognosis*. Oncol Rep, 2008. **20**(6): p. 1409-17.

39. Fan, S., et al., *Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4 (eIF4E) is elevated in human cancer tissues*. *Cancer Biol Ther*, 2009. **8**(15): p. 1463-9.
40. Yoshizawa, A., et al., *Overexpression of phospho-eIF4E is associated with survival through AKT pathway in non-small cell lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(1): p. 240-8.
41. Silvera, D., et al., *Essential role for eIF4GI overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(7): p. 903-8.
42. Comtesse, N., et al., *Frequent overexpression of the genes FXR1, CLAPM1 and EIF4G located on amplicon 3q26-27 in squamous cell carcinoma of the lung*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(12): p. 2538-44.
43. Bauer, C., et al., *Translation initiation factor eIF-4G is immunogenic, overexpressed, and amplified in patients with squamous cell lung carcinoma*. *Cancer*, 2001. **92**(4): p. 822-9.
44. Bauer, C., et al., *Overexpression of the eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G-1) in squamous cell lung carcinoma*. *Int J Cancer*, 2002. **98**(2): p. 181-5.
45. Brass, N., et al., *Translation initiation factor eIF-4gamma is encoded by an amplified gene and induces an immune response in squamous cell lung carcinoma*. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(1): p. 33-9.
46. Braunstein, S., et al., *A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer*. *Mol Cell*, 2007. **28**(3): p. 501-12.
47. Castellvi, J., et al., *Cell signaling in endometrial carcinoma: phosphorylated 4E-binding protein-1 expression in endometrial cancer correlates with aggressive tumors and prognosis*. *Hum Pathol*, 2009. **40**(10): p. 1418-26.
48. Shuda, M., et al., *Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma*. *Anticancer Res*, 2000. **20**(4): p. 2489-94.
49. Eberle, J., K. Krasagakis, and C.E. Orfanos, *Translation initiation factor eIF-4A1 mRNA is consistently overexpressed in human melanoma cells in vitro*. *Int J Cancer*, 1997. **71**(3): p. 396-401.



***PUBLICACIONES***

## Critical Review

# The Mitochondrial Bioenergetic Capacity of Carcinomas

Laura Formentini, Inmaculada Martínez-Reyes and José M. Cuezva

*Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras CIBERER-ISCIII, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain*

---

### Summary

Metabolic reprogramming of cancer cells is a phenotypic trait necessary to promote proliferation and survival. Despite past controversies, recent transcriptomic, proteomic, functional and structural studies of mitochondria of the cancer cell indicate that an impaired biogenesis and activity of the organelle is required for the development of some tumors. Cancer aggressiveness can be estimated by its bioenergetic signature, a protein ratio that correlates the expression of  $\beta$ -F1-ATPase of oxidative phosphorylation relative to the glycolytic GAPDH. The bioenergetic signature also provides a gauge that informs of the metabolic activity of tumors and cancer cells as well as of the response to chemotherapy. The convergence of different epithelial tumors on the same bioenergetic signature supports that it provides an important tool and common target for cancer therapy. We stress that targeting the energetic metabolism of tumors affords a valuable strategy to combat the disease. © 2010 IUBMB

*IUBMB Life*, 62(7): 554–560, 2010

---

**Keywords** mitochondria; glycolysis; cancer; H<sup>+</sup>-ATP synthase; Warburg phenotype; energetic metabolism.

### INTRODUCTION

Mitochondria are dynamic organelles that play key functional roles in the physiology of eukaryotic cells. The provision of metabolic energy by oxidative phosphorylation, the execution of cell death and intracellular signaling by Ca<sup>2+</sup> and reactive oxygen species (ROS) are main functions of mitochondria. Therefore, genetic and/or epigenetic alterations that interfere with the functions of the organelle are likely to cause or be involved in the development of human pathology (1).

Cancer is a heterogeneous and complex genetic disease that drives the transformation of normal cells into malignancy by mutations in oncogenes and tumor suppressor genes. However, the onset and progression of cancer is also linked to the cellular microenvironment and other epigenetic events that influence the phenotype of the transformed cell (2). In this regard, the seminal contribution of Hanahan and Weinberg (2) established six main traits acquired by cells in their progression to malignancy: an unlimited replicative capacity, sustained angiogenesis, evasion of apoptosis, self-sufficiency in growth signals, insensitivity to anti-growth signals and tissue invasion and metastasis (2). Recently, the metabolic reprogramming of cancer cells has been added to the list of hallmarks, based on cumulative transcriptomic, proteomic and functional evidences of the peculiar energetic metabolism of cancer cells (1, 3–8). Paradoxically, metabolic reprogramming of the cancer cell represents the renaissance of the largely neglected role of energetic metabolism in the field of cancer after the pioneer observation of Otto Warburg (9–11). He observed that tumors have an abnormal high rate of aerobic glycolysis when compared with nontumor tissues, *i.e.*, consume large amounts of glucose and produce lactate in the presence of oxygen (9–11). In this review, we will emphasize the integration of energetic metabolism and the prominent role played by the bioenergetic activity of mitochondria in determining the Warburg phenotype of cancer cells. We will also summarize the genetic and epigenetic pathways that could mediate such metabolic reprogramming. Other aspects of the contribution of mitochondria to cancer biology have been recently reviewed (1, 4, 7, 12).

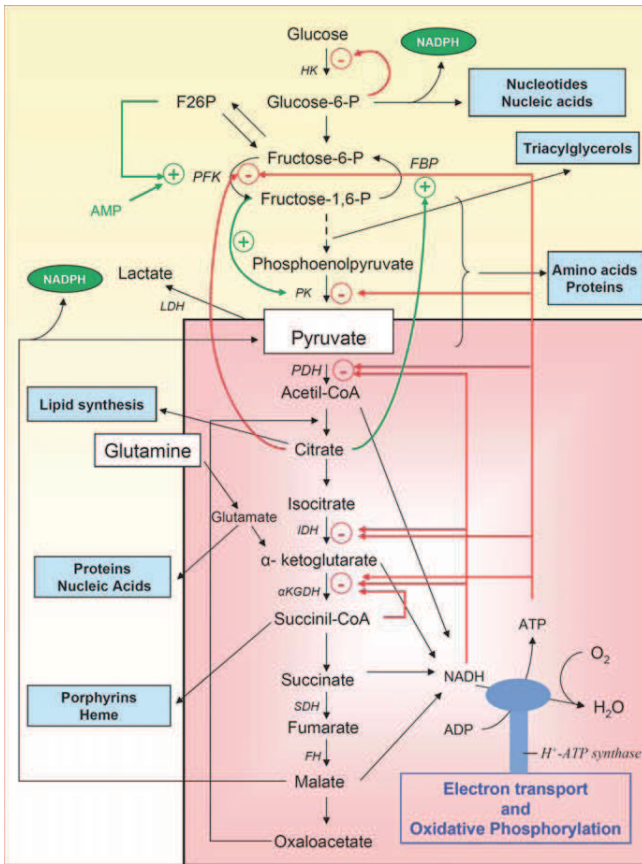
### Energetic Metabolism of Proliferating Cells

Glycolysis and oxidative phosphorylation are the metabolic pathways relevant for energy provision during cellular proliferation (Fig. 1). Glycolysis, when compared with mitochondrial oxidative phosphorylation, is a very low-energy providing pathway (~18-fold less) but supplies many of the metabolic intermediates required for the biosynthesis of macromolecules

---

Received 26 February 2010; accepted 10 May 2010

Address correspondence to: Prof. José M. Cuezva, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain. Tel: 34 91 196 4618. Fax: 34 91 196 4420. E-mail: jmcuezva@cbm.uam.es



**Figure 1.** Regulation of the pathways of energetic metabolism. Glucose is oxidized in the cytoplasm (yellow) to yield pyruvate by the action of glycolytic enzymes. Pyruvate could be either reduced to lactate by lactate dehydrogenase (LDH) or oxidized in mitochondria (pink) by the sequential action of pyruvate dehydrogenase (PDH) and the enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Electron transport and oxidative phosphorylation drive the synthesis of ATP by the  $H^+$ -ATP synthase (blue stalk). Glucose carbon skeletons are drained at various sites of the pathways for the synthesis of cellular building blocks (light blue squares) as well as for obtaining the needed reducing power used in biosynthetic processes (green ellipses). The entrance of glutamine in the TCA cycle is indicated. Red arrows denote the negative regulation exerted by NADH, ATP and citrate in key enzymes of energetic metabolism. Green arrows denote the positive regulation exerted by metabolic intermediates in these pathways. HK, hexokinase; PFK, phosphofructo-1-kinase; PK, pyruvate kinase; FBP, fructose biphosphatase; IDH, isocitrate dehydrogenase;  $\alpha$ KGDH,  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase; SDH, succinate dehydrogenase; FH, fumarate hydratase.

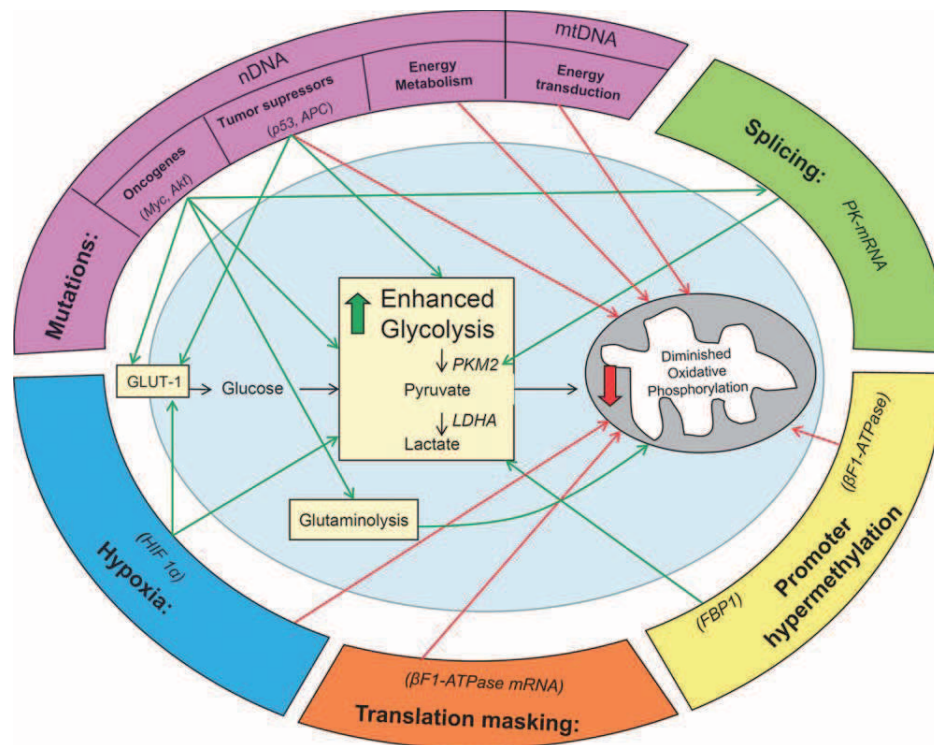
(Fig. 1). Proliferation by glycolysis is thus possible because cells, either from a tumor, an embryo or in culture, have a non-restrained availability of metabolic precursors (glucose/glutamine) (Fig. 1) for the biosynthesis of their constituents. These

pathways are tightly regulated during the cell cycle of the eukaryotic cell (13) and, whereas the buildup of cellular components at G1 (the oxidative phase of the cycle) requires the functional activity of mitochondria (14), progression through the synthesis (S-phase) and G2/M phases (so-called reductive metabolic phases) (13), is linked to the repression of mitochondrial function and the burst of glycolysis (1, 15). Indeed, when lymphocytes and thymocytes are stimulated to proliferate, aerobic glycolysis is sharply increased and oxygen consumption and the production of reactive oxygen species (ROS) sharply diminished (see (1) and references therein). The onset of glycolysis and the repression of mitochondrial respiration in S phase have the functional advantage of obliterating the production of ROS at a time when DNA molecules are most vulnerable to oxidative damage. Interestingly, Myc is a master regulator of the metabolic pathways that drive cell cycle progression (16) and cyclin D1, which represses mitochondrial activity (15), plays a prominent role in the metabolic transition at the G1/S boundary. In any case, a conclusion that stems from the metabolic trait of proliferating tissues, either cancerous or not, is that the expression of proteomic markers of energetic metabolism should differ when compared with nonproliferating tissues.

### Integration of Glycolysis and Respiration

Energetic metabolism is delicately controlled by the availability of ATP, NADH and some metabolic intermediates (Fig. 1). In the cytoplasm, glucose is partially oxidized to pyruvate by glycolysis (Fig. 1). Pyruvate could have various fates, either it is reduced to lactate to regenerate  $NAD^+$  or enters the mitochondria where its carbon skeleton is completely oxidized to  $CO_2$  by the sequential action of pyruvate dehydrogenase (PDH) and the enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle (Fig. 1). The electrons obtained in oxidations and collected in NADH are transferred to the respiratory chain to generate the proton electrochemical gradient that will be used by the mitochondrial  $H^+$ -ATP synthase for the synthesis of ATP (Fig. 1). In nonproliferating cells, the demand for glucose is low because the requirement for carbon skeletons is low and the complete oxidation of glucose by mitochondrial activity provides a high yield of ATP and NADH (Fig. 1). The cellular availability of ATP and NADH coordinate the down-regulation of the activity of key enzymes of energetic metabolism limiting the flux of matter and the production of biological energy through these pathways (Fig. 1) (1). On the contrary, proliferating cells take up considerably much larger amounts of glucose due to the continuous draining of metabolic intermediates (Fig. 1), the need for NADPH for biosynthetic purposes (Fig. 1) and the metabolic oscillations inherent to cell cycle progression (13) that boost the glucose consumption rate as well as its partial aerobic oxidation to lactate (1). The catabolism of glutamine is also of relevance during proliferation and in oncogenesis because replenishes the TCA cycle with carbon skeletons (17, 18).





**Figure 2.** Summary of the mechanisms that mediate the Warburg phenotype. Different genetic, epigenetic and environmental mechanisms that are known to promote the enhancement of glycolysis (green lines) or the repression of the bioenergetic activity of mitochondria (red lines) are indicated.

Likewise, when cells have to adapt to a hypoxic environment or have a genetic alteration that impinges in the energy provision activity of mitochondria, the flux of glycolysis and concomitant production of lactate should increase to provide sufficient energy to maintain cellular functions. Activation/repression of glycolysis is driven by short-term allosteric regulation of PFK and PK (Fig. 1) as a result of changes in the cellular availability of ATP and NADH (Fig. 1). However, there are physiological situations in which the activation of the enzymes of glycolysis is not enough to cope with the cellular demand of carbon skeletons and energy required to sustain proliferation. The proliferation of hepatocytes during development of the fetal liver (12, 19) and of cancer cells in tumors (20, 21) provide two examples in which the induction of glycolytic genes and the repression of mitochondrial biogenesis accompany cellular proliferation.

### The Bioenergetic Phenotype of Carcinomas

As discussed earlier, the energetic metabolism of any proliferating cell, cancerous or noncancerous, should be based on an active glycolysis. Gene expression and proteomic analysis have identified a common metabolic signature of cancer demonstrating that the increased expression of enzymes of the glycolytic pathway indeed represents a hallmark of malignant cells (see (1) and references therein). Furthermore, it is well established that tumor

cells express embryonic-type isoforms of many of the enzymes of glycolysis, which is a very active pathway during development of the mammalian embryo (12). Recently, the switch to the embryonic M2 isoform of the glycolytic enzyme pyruvate kinase (Fig. 1) has been shown to promote tumorigenesis (22).

A debated question is whether the abnormal aerobic glycolysis of cancer cells results from an impaired bioenergetic activity of mitochondria as it was originally suggested by Warburg (9–11). There is a large body of data that sustain that mitochondria are structurally and functionally altered in the cancer cell (1, 4, 6, 7, 23–26). Consistent with an impaired bioenergetic function of mitochondria in cancer a large number of somatic mutations in mtDNA have been described in different neoplasias (Fig. 2) (25–27). Moreover, mutations in enzymes of the TCA cycle (Fig. 2) also link mitochondrial dysfunction with oncogenesis (28, 29).

The metabolic and enzymatic analogies that exist between the phenotype of cancer cells and embryonic tissues go far beyond the expression of protein isoforms of glycolytic enzymes and also include a similar trend in the expression of markers of the two pathways of energetic metabolism as well as the operation of the same mechanisms that control the biogenesis of mitochondria (12). Indeed, the expression level of  $\beta$ -F1-ATPase, the catalytic subunit of the  $H^+$ -ATP synthase (Fig. 1), and thus a rate-limiting component of mitochondrial oxidative phosphorylation, inversely correlates with the expression of

markers of the glycolytic pathway (GAPDH, HK, *etc.*) during development of the liver (12). Likewise, a test to assess the protein signature of energetic metabolism in normal and tumor biopsies derived from the same cancer patients confirmed that  $\beta$ -F1-ATPase expression is inversely correlated with the expression of GAPDH in most human carcinomas (5). The tumor drop in the  $\beta$ -F1-ATPase/GAPDH ratio suggests a deficit in the overall cellular activity of mitochondria in the cancer cell consistent with Warburg's postulates. This analysis was defined as the bioenergetic signature (1, 5). Recently, the quantitative determination of the bioenergetic signature revealed that tumors from different tissues and/or histological types have the same proteomic signature of energetic metabolism (30), indicating that cancer abolishes the tissue-specific differences in the bioenergetic phenotype of mitochondria. These findings have been confirmed in other laboratories (31) (and see (1) for extensive review of the literature).

Positron emission tomography using the glucose analog 2-deoxy-2-[ $^{18}$ F]-D-glucose as probe (FDG-PET) has conclusively demonstrated that the majority of human carcinomas fulfil the enhanced glycolytic criteria first observed by Warburg. Moreover, it has been demonstrated that the bioenergetic signature of cancer cells and tumors inversely correlate with the rates of aerobic glycolysis and the rates of glucose capture as assessed by FDG-PET imaging (32). These findings strongly support that the down-regulation of the bioenergetic function of mitochondria is part of the mechanism that triggers the increased glucose avidity of tumors (20, 32).

Analysis of the bioenergetic signature in large cohorts of different tumors have further emphasized that the expression of  $\beta$ -F1-ATPase affords an excellent marker of the prognosis of patients with breast (33, 34), colon (5, 31) and lung (32, 35) cancer. Likewise, a high tumor rate of FDG uptake is also a significant predictor of an unfavorable outcome in lung cancer (32). Moreover, the tumor expression of  $\beta$ -F1-ATPase is an independent marker of survival in breast and lung cancer as assessed by multivariate Cox regression analysis (32, 34). Recently, these findings have been confirmed in a different large cohort of patients with colon cancer (31). Thus, the alteration of the bioenergetic signature strongly supports a relevant role for the mitochondrial impairment of the cancer cell in progression of the disease. In addition, the bioenergetic signature also predicts the response to chemotherapy in various cancer cells (36, 37) as well as in colorectal tumors (31), consistent with the role of the  $H^+$ -ATP synthase in signaling the execution of cell death (36) (and references therein).

### **Repression of Mitochondrial Biogenesis in Cancer**

Cancer cells repress the biogenesis of mitochondria to acquire a glycolytic phenotype with little or no dependence on oxidative phosphorylation (21). Post-transcriptional regulation by translational control of the mRNA that encodes  $\beta$ -F1-ATPase ( $\beta$ -mRNA) in fetal liver (12, 38), during the cell cycle (39) and

in rat (21) and human (40) carcinomas (Fig. 2) partially explain the abnormal biogenesis of mitochondria in these situations. The 3'UTR of  $\beta$ -mRNA is required for efficient translation of the transcript (21, 38, 41, 40) and translation masking of  $\beta$ -mRNA is observed in fetal rat liver (38) and in rat (21) and human (40) carcinomas (Fig. 2). In this context, the identification of the  $\beta$ -mRNA binding molecules that interact and presumably hamper translation of the transcript is of utmost importance to understand the bioenergetic phenotype of cancer cells. Recently, the AU-rich element (ARE) binding protein HuR, a central regulator of post-transcriptional gene expression, has been identified as a 3'UTR  $\beta$ -mRNA interacting protein (33). Although HuR plays no relevant role in regulating  $\beta$ -F1-ATPase expression (33), it affords a relevant independent marker of breast cancer prognosis and, when studied in combination with the bioenergetic signature of the tumor, allows the identification of patients with breast cancer, who are at high risk of disease recurrence (33). Contrary to the findings in breast, colon and lung cancer, in which the down-regulation of  $\beta$ -F1-ATPase expression is exerted at the level of translation (40) (Fig. 2), the silencing of  $\beta$ -F1-ATPase expression in leukemia is mediated by hypermethylation of the promoter of the gene (42) (Fig. 2). We suggest that alterations in the turnover of mitochondrial proteins are also likely to contribute to the abnormal bioenergetic phenotype of some human tumors.

Because the contribution that mitochondrial bioenergetics could have in cancer is still debated, we have recently generated colon cancer cell lines that express different levels of the  $\beta$ -F1-ATPase to assess the contribution of mitochondrial bioenergetics in cancer progression (20). The generated cells exhibit large ultrastructural, transcriptomic, proteomic and functional differences in their mitochondria and in their *in vivo* tumor forming capacity. We have confirmed that the activity of oxidative phosphorylation defines the rate of glucose utilization by aerobic glycolysis, supporting the relevance of the Pasteur Effect in cancer biology (Fig. 1) (20). The aggressive cellular phenotype, which is highly glycolytic, is bound to the deregulated expression of genes involved in energetic metabolism as well as in the regulation of the cell cycle, apoptosis, angiogenesis and cell adhesion (4, 7, 20). Remarkably, the molecular and ultrastructural analysis of the tumors derived from the different cell lines implanted highlighted that tumor promotion inevitably requires the selection of cancer cells with a repressed biogenesis and functional activity of mitochondria, *i.e.*, the highly glycolytic phenotype is selected for tumor development. In other words, cancer cells with a functional bioenergetic activity of mitochondria are unable to promote tumor development (20) in agreement with findings that functional organelles halt proliferation (1, 3). In the same study, we demonstrate that the high glycolytic phenotype of the cells is a nongenetically acquired condition imposed by the cellular microenvironment that further provides a cell-death resistant phenotype (20). Indeed, the treatment of cancer cells with dichloroacetate partially restores the functional differentiation of mitochondria, halts proliferation

and promotes tumor regression, further emphasizing the reversible nature of the metabolic trait of cancer and its potential Achilles heel (4, 20). Overall, these findings strongly support the tumor suppressor function of the bioenergetic activity of mitochondria (1).

### The Impact of Cancer Genes on Energetic Metabolism

Studies aimed at establishing a link between malignant growth and the enforced glycolysis of cancer cells have uncovered diverse mechanisms that affect glycolysis, oxidative phosphorylation or both pathways (1, 8). For instance, gain-of-function mutations in the oncogene *c-myc* transactivate glycolytic genes as well as the glucose transporter GLUT1, enhancing both glucose uptake and lactate production (43) (Fig. 2). A direct role for *c-myc* in mitochondrial biogenesis and progression through the cell cycle and tumorigenesis has been described (16). Furthermore, deregulated *c-myc* also enhances glutaminolysis (44) (Fig. 2), which is a relevant pathway for cellular proliferation through the repression of miRNA 23a and miRNA23b (45). Deregulated *c-myc* is also responsible for the increased expression of the RNA binding proteins hnRNPI (PTB), hnRNPA1 and hnRNPA2 in human tumors (46) (Fig. 2). These proteins ensure the inclusion of exon 10 in the splicing of the pyruvate kinase gene rendering the PKM2 isoform (Fig. 2) (46) that diverts pyruvate from mitochondria and promotes aerobic glycolysis and tumorigenesis (22).

The rapid proliferation of cancer cells often generates a hypoxic microenvironment triggering the stabilization of the hypoxia inducible factor 1 alpha (*HIF-1 $\alpha$* ) (47). *HIF-1 $\alpha$*  induces the expression of many glycolytic enzymes, including LDHA and GLUT1 (Fig. 2), and cooperates with *c-myc* to induce the expression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) and hexokinase II (HK-II), two additional paths that favor the glycolytic phenotype of cancer cells (48). Moreover, *HIF-1 $\alpha$*  contributes to the repression of the biogenesis of mitochondria by inhibiting *c-myc* activity (49) and also affects mitochondrial respiration by switching the molecular composition of cytochrome c oxidase (50).

The oncogene Akt is a relevant molecule that signals both proliferation and resistance to cell death. Moreover, Akt produces a dose-dependent stimulation of glycolysis that correlates with tumor aggressiveness *in vivo* (Fig. 2) (51, 52). Mitochondrial respiratory defects promote the inactivation of PTEN, which leads to Akt activation resulting in drug resistance and survival advantage under hypoxic conditions (53).

Two independent studies have highlighted that the tumor suppressor p53 also has a metabolic role in cancer (Fig. 2) (54, 55). The product of a p53 targeted gene, *TIGAR* (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator) down-regulates glycolysis, and so, under conditions of p53 loss of function, glycolysis is increased (54). Likewise, loss of function of p53 results in decreased mitochondrial respiration and the metabolic shift to aerobic glycolysis (Fig. 2) (55). Recently, the tumor suppressor

E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 has been shown to degrade the glycolysis promoting enzyme PFKFB3 and mutations in this gene are also likely to promote the shift of cancer cells to a Warburg phenotype (Fig. 2) (56).

Finally, epigenetic mechanisms that trigger the silencing of relevant genes involved in both gluconeogenesis and oxidative phosphorylation have been described to affect the metabolism of cancer cells (Fig. 2). Hypermethylation of the fructose-1,6-biphosphatase-1 (FBP1) promoter (57), an enzyme that antagonizes the flux of glycolysis (Fig. 1), and of the  $\beta$ -F1-ATPase gene promoter (42), that renders cells with a defective mitochondria have been reported (Fig. 2).

Overall, we suggest that the characterization of the mechanisms that promote the repression of mitochondrial activity in tumors will contribute to transform cancer into a chronic disease.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia BFU2007-65253, by the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII and by Comunidad de Madrid (S-GEN-0269), Spain. The CBMSO receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces. We apologize to many authors whose work or primary references have not been quoted owing to space limitations.

### REFERENCES

1. Cuezva, J. M., Ortega, A. D., Willers, I., Sanchez-Cenizo, L., Aldea, M., and Sanchez-Arago, M. (2009) The tumor suppressor function of mitochondria: translation into the clinics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1792**, 1145–1158.
2. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70.
3. Schulz, T. J., Thierbach, R., Voigt, A., Drewes, G., Mietzner, B., Steinberg, P., Pfeiffer, A. F., and Ristow, M. (2006) Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J. Biol. Chem.* **281**, 977–981.
4. Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008) Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* **13**, 472–482.
5. Cuezva, J. M., Krajewska, M., de Heredia, M. L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J. M., Marusawa, H., Chamorro, M., and Reed, J. C. (2002) The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res.* **62**, 6674–6681.
6. Thierbach, R., Schulz, T. J., Isken, F., Voigt, A., Mietzner, B., Drewes, G., von Kleist-Retzow, J. C., Wiesner, R. J., Magnuson, M. A., Puccio, H., Pfeiffer, A. F., Steinberg, P., and Ristow, M. (2005) Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3857–3864.
7. Kroemer, G. (2006) Mitochondria in cancer. *Oncogene* **25**, 4630–4632.
8. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., and Thompson, C. B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033.
9. Warburg, O., Wind, F., Negelein, E. (1927) The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.* **8**, 519–530.
10. Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314.
11. Warburg, O. (1956) On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269–270.

12. Cuezva, J. M., Sanchez-Arago, M., Sala, S., Blanco-Rivero, A., Ortega, A. D. (2007) A message emerging from development: the repression of mitochondrial beta-F1-ATPase expression in cancer. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 259–265.
13. Tu, B. P., and McKnight, S. L. (2006) Metabolic cycles as an underlying basis of biological oscillations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 696–701.
14. Schieke, S. M., McCoy, J. P., Jr., and Finkel, T. (2008) Coordination of mitochondrial bioenergetics with G1 phase cell cycle progression. *Cell Cycle* **7**, 1782–1787.
15. Wang, C., Li, Z., Lu, Y., Du, R., Katiyar, S., Yang, J., Fu, M., Leader, J.E., Quong, A., Novikoff, P. M., and Pestell, R. G. (2006) Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11567–11572.
16. Morrish, F., Neretti, N., Sedivy, J. M., and Hockenbery, D. M. (2008) The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry. *Cell Cycle* **7**, 1054–1066.
17. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C. B. (2008) The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* **7**, 11–20.
18. Kovacevic, Z., and Morris, H. P. (1972) The role of glutamine in the oxidative metabolism of malignant cells. *Cancer Res.* **32**, 326–333.
19. Valcarce, C., Navarrete, R. M., Encabo, P., Loeches, E., Satrustegui, J., and Cuezva, J. M. (1988) Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **263**, 7767–7775.
20. Sánchez-Aragó, M., Chamorro, M., and Cuezva, J. M. (2010) Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis* **31**, 567–576.
21. de Heredia, M. L., Izquierdo, J. M., and Cuezva, J. M. (2000) A conserved mechanism for controlling the translation of beta-F1-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 7430–7437.
22. Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., Fleming, M. D., Schreiber, S. L., and Cantley, L. C. (2008) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* **452**, 230–233.
23. LaNoue, K. H., Ohnishi, J. G., Morris, T., and Williamson, H. P., Jr. (1974) Defects of anions and electron transport in morris hepatoma mitochondria. In: *Hormones and Cancer* (McKerns KW, ed.). pp. 131–165, New York, Academic Press.
24. Pedersen, P. L. (1978) Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog. Exp. Tumor Res.* **22**, 190–274.
25. Hoberman, H. D. (1975) Is there a role for mitochondrial genes in carcinogenesis? *Cancer Res.* **35**, 3332–3335.
26. Gause, G.F. (1969) Cancer and mitochondrial DNA. *Br. Med. J.* **3**, 413–414.
27. Brandon, M., Baldi, P., and Wallace, D. C. (2006) Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* **25**, 4647–4662.
28. King, A., Selak, M. A., and Gottlieb, E. (2006) Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* **25**, 4675–4682.
29. Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., Fantin, V. R., Jang, H. G., Jin, S., Keenan, M. C., Marks, K. M., Prins, R. M., Ward, P. S., Yen, K. E., Liaw, L. M., Rabinowitz, J. D., Cantley, L. C., Thompson, C. B., Vander Heiden, M. G., and Su, S. M. (2009) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **462**, 739–744.
30. Acebo, P., Giner, D., Calvo, P., Blanco-Rivero, A., Ortega, A. D., Fernandez, P. L., Roncador, G., Fernandez-Malave, E., Chamorro, M., and Cuezva, J. M. (2009) Cancer abolishes the tissue type-specific differences in the phenotype of energetic metabolism. *Transl. Oncol.* **2**, 138–145.
31. Lin, P. C., Lin, J. K., Yang, S. H., Wang, H. S., Li, A. F., and Chang, S. C. (2008) Expression of beta-F1-ATPase and mitochondrial transcription factor A and the change in mitochondrial DNA content in colorectal cancer: clinical data analysis and evidence from an in vitro study. *Int. J. Colorectal Dis.* **23**, 1223–1232.
32. Lopez-Rios, F., Sanchez-Arago, M., Garcia-Garcia, E., Ortega, A. D., Berrendero, J. R., Pozo-Rodriguez, F., Lopez-Encuentra, A., Ballestin, C., and Cuezva, J. M. (2007) Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res.* **67**, 9013–9017.
33. Ortega, A. D., Sala, S., Espinosa, E., Gonzalez-Baron, M., and Cuezva, J. M. (2008) HuR and the bioenergetic signature of breast cancer: a low tumor expression of the RNA-binding protein predicts a higher risk of disease recurrence. *Carcinogenesis* **29**, 2053–2061.
34. Isidoro, A., Casado, E., Redondo, A., Acebo, P., Espinosa, E., Alonso, A. M., Cejas, P., Hardisson, D., Fresno Vara, J. A., Belda-Iniesta, C., Gonzalez-Baron, M., and Cuezva, J. M. (2005) Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* **26**, 2095–2104.
35. Cuezva, J. M., Chen, G., Alonso, A. M., Isidoro, A., Misek, D. E., Hanash, S. M., and Beer, D. G. (2004) The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* **25**, 1157–1163.
36. Santamaria, G., Martinez-Diez, M., Fabregat, I., and Cuezva, J. M. (2006) Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase. *Carcinogenesis* **27**, 925–935.
37. Shin, Y. K., Yoo, B. C., Chang, H. J., Jeon, E., Hong, S. H., Jung, M. S., Lim, S. J., and Park, J. G. (2005) Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res.* **65**, 3162–3170.
38. Izquierdo, J. M., and Cuezva, J. M. (1997) Control of the translational efficiency of beta-F1-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Mol. Cell Biol.* **17**, 5255–5268.
39. Martinez-Diez, M., Santamaria, G., Ortega, A. D., and Cuezva, J. M. (2006) Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3'UTRs. *PLoS ONE* **1**, e107.
40. Willers, I. M., Isidoro, A., Ortega, A. D., Fernández, P. L., and Cuezva, J. M. (2010) Selective inhibition of beta-F1-ATPase mRNA translation in human tumors. *Biochem. J.* **426**, 319–326.
41. Izquierdo, J. M., and Cuezva, J. M. (2000) Internal-ribosome-entry-site functional activity of the 3'-untranslated region of the mRNA for the beta subunit of mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase. *Biochem. J.* **346**(Pt 3), 849–855.
42. Li, R. J., Zhang, G. S., Chen, Y. H., Zhu, J. F., Lu, Q. J., Gong, F. J., and Kuang, W. Y. (2009) Down-regulation of mitochondrial ATPase by hypermethylation mechanism in chronic myeloid leukemia is associated with multidrug resistance. *Ann. Oncol.* [Epub ahead of print].
43. Osthur, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L. A., and Dang, C. V. (2000) Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* **275**, 21797–21800.
44. Kovacevic, Z., and Morris, H. P. (1972) The role of glutamine in the oxidative metabolism of malignant cells. *Cancer Res.* **32**, 326–333.
45. Gao, P., Tchermyshev, I., Chang, T. C., Lee, Y. S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K. I., De Marzo, A. M., Van Eyk, J. E., Mendell, J. T., and Dang, C. V. (2009) c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutamine expression and glutamine metabolism. *Nature* **458**, 762–765.
46. David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., and Manley, J. L. (2010) HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* **463**, 364–368.
47. Semenza, G. L. (2008) Hypoxia-inducible factor 1 and cancer pathogenesis. *IUBMB Life.* **60**, 591–597.
48. Kim, J. W., Gao, P., Liu, Y. C., Semenza, G. L., and Dang, C. V. (2007) Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol. Cell Biol.* **27**, 7381–7393.

49. Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K. I., Dang, C. V., and Semenza, G. L. (2007) HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* **11**, 407–420.
50. Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J. W., Shimoda, L., Dang, C. V., and Semenza, G. L. (2007) HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* **129**, 111–122.
51. Govindarajan, B., Sligh, J. E., Vincent, B. J., Li, M., Canter, J. A., Nickoloff, B. J., Rodenburg, R. J., Smeitink, J. A., Oberley, L., Zhang, Y., Slingerland, J., Arnold, R. S., Lambeth, J. D., Cohen, C., Hilenski, L., Griendling, K., Martinez-Diez, M., Cuezva, J. M., and Arbiser, J. L. (2007) Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *J. Clin. Invest.* **117**, 719–729.
52. Plas, D. R., and Thompson, C. B. (2005) Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* **24**, 7435–7442.
53. Pelicano, H., Xu, R. H., Du, M., Feng, L., Sasaki, R., Carew, J. S., Hu, Y., Ramdas, L., Hu, L., Keating, M. J., Zhang, W., Plunkett, W., and Huang, P. (2006) Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J. Cell Biol.* **175**, 913–923.
54. Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M. A., Vidal, M. N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K. H. (2006) TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* **126**, 107–120.
55. Matoba, S., Kang, J. G., Patino, W. D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P. J., Bunz, F., and Hwang, P. M. (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* **312**, 1650–1653.
56. Almeida, A., Bolanos, J. P., and Moncada, S. (2010) E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 738–741.
57. Liu, X., Wang, X., Zhang, J., Lam, E. K., Shin, V. Y., Cheng, A. S., Yu, J., Chan, F. K., Sung, J. J., and Jin, H. C. (2010) Warburg effect revisited: an epigenetic link between glycolysis and gastric carcinogenesis. *Oncogene* **29**, 442–450.

# AMPK and GCN2–ATF4 signal the repression of mitochondria in colon cancer cells

Inmaculada MARTÍNEZ-REYES, María SÁNCHEZ-ARAGÓ and José M. CUEZVA<sup>1</sup>

Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras CIBERER-ISCIII, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

Reprogramming of energetic metabolism is a phenotypic trait of cancer in which mitochondrial dysfunction represents a key event in tumour progression. In the present study, we show that the acquisition of the tumour-promoting phenotype in colon cancer HCT116 cells treated with oligomycin to inhibit ATP synthase is exerted by repression of the synthesis of nuclear-encoded mitochondrial proteins in a process that is regulated at the level of translation. Remarkably, the synthesis of glycolytic proteins is not affected in this situation. Changes in translational control of mitochondrial proteins are signalled by the activation of AMPK (AMP-activated protein kinase) and the GCN2 (general control non-derepressible 2) kinase, leading also to the activation of

autophagy. Changes in the bioenergetic function of mitochondria are mimicked by the activation of AMPK and the silencing of ATF4 (activating transcription factor 4). These findings emphasize the relevance of translational control for normal mitochondrial function and for the progression of cancer. Moreover, they demonstrate that glycolysis and oxidative phosphorylation are controlled at different levels of gene expression, offering the cell a mechanistic safeguard strategy for metabolic adaptation under stressful conditions.

**Key words:** ATP synthase, cancer, cellular stress, glycolysis, mitochondrion, translational control.

## INTRODUCTION

Mitochondria play a central role in the homeostasis of higher eukaryotic cells. The provision of metabolic energy by oxidative phosphorylation, the execution of cell death and intracellular signalling by  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS (reactive oxygen species) are the main cellular functions of the organelle. A growing number of human diseases, including cancer, are associated with the molecular and/or functional alteration of mitochondria [1,2]. The biogenesis of mitochondria is a complex genetic programme that requires the concerted transcriptional response of nuclear and mitochondrial genes [3]. However, mechanisms that control the localization and translation of mRNAs also contribute to define the mitochondrial phenotype of the cell, offering the biogenesis of the  $\text{H}^+$ -ATP synthase a paradigm in this regard [4]. Indeed, a master regulator in the provision of metabolic energy by oxidative phosphorylation is the mitochondrial  $\text{H}^+$ -ATP synthase, a rotary engine that utilizes the proton electrochemical gradient generated by the respiratory chain as a driving force for the phosphorylation of ADP [5].

Cancer is a complex genetic disease in which the tumour microenvironment plays a fundamental role for disease progression [6,7]. A hallmark of cancer cells and tumours is their peculiar energy metabolism [1,8]. Carcinomas display increased glucose consumption rates due to a low activity of

oxidative phosphorylation, concurrently showing higher rates of lactate production when compared with normal tissues [9]. It has been consistently reported that the relative expression of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase ( $\beta$  catalytic subunit of the mitochondrial  $\text{H}^+$ -ATP synthase), which is the catalytic subunit of the  $\text{H}^+$ -ATP synthase, is significantly diminished in tumours when compared with its expression in normal tissues [1,10]. In a large number of different carcinomas, the down-regulation of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase is accompanied by an increased expression of markers of the glycolytic pathway [1,10]. This proteomic feature of cancer defines a 'bioenergetic signature' of clinical relevance as an indicator of disease progression in colon, lung and breast cancer patients (for reviews see [1,4]) as well as a predictive marker of the cellular response to chemotherapy [1,11,12]. Remarkably, recent findings have demonstrated that the activity of the  $\text{H}^+$ -ATP synthase itself is inhibited in human carcinomas by up-regulation of its physiological inhibitor IF1, which is a relevant regulator of energetic metabolism in cancer cells [13]. The expression of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase in developing liver [14,15], brown adipose tissue [16], during progression through the cell cycle [17], and in rat [18] and human [19] carcinomas is exerted at the level of translation and mediated largely by the 3'UTR (untranslated region) of the mRNA [14,18,19]. Similar findings have been obtained in yeast, where deletion of the 3'UTR leads to reduced ATP synthesis and respiratory dysfunction [20]. In addition,

Abbreviations used: a.u., arbitrary units; ACC, acetyl-CoA carboxylase; AICAR, 5-amino-4-imidazolecarboxamide 1- $\beta$ -D-ribofuranoside; AMPK, AMP-activated protein kinase; ATF4, activating transcription factor 4; BRR, basal respiratory rate; COX, cytochrome *c* oxidase; eIF, eukaryotic initiation factor; DNP, 2,4-dinitrophenol; 4EBP1, eIF4E-binding protein 1; F, forward;  $\alpha$ -F<sub>1</sub>-ATPase,  $\alpha$  catalytic subunit of the mitochondrial  $\text{H}^+$ -ATP synthase;  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase,  $\beta$  catalytic subunit of the mitochondrial  $\text{H}^+$ -ATP synthase; G3BP1, GTPase-activating protein-binding protein 1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GCN2, general control non-derepressible 2; GFP, green fluorescent protein; GRK2, G-protein-coupled receptor kinase 2; HIF, hypoxia-inducible factor; Hsp60, heat-shock protein 60; HuR, ELAV (embryonic lethal abnormal vision)-like protein; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3 $\alpha$ ; mtDNA, mitochondrial DNA; mTOR, mammalian target of rapamycin; MRR, maximum respiratory rate; nDNA, nuclear DNA; OL, oligomycin; OSR, OL-sensitive respiratory rate; p-, phospho-; p38<sup>MAPK</sup>, mitogen-activated protein kinase 14; p62, sequestosome 1; p70<sup>S6K</sup>, ribosomal protein S6 kinase, 70 kDa, polypeptide 1; PDH, pyruvate dehydrogenase; PGC1 $\alpha$ , peroxisome-proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1 $\alpha$ ; PK, pyruvate kinase; qRT-PCR, quantitative real-time PCR; R, reverse; raptor, regulatory-associated protein of mTOR; RNABP, RNA-binding protein; ROS, reactive oxygen species; RT, reverse transcription; SDH, succinate dehydrogenase; siRNA, small interfering RNA; TCA, trichloroacetic acid; ULK1, unc-51-like kinase 1; UTR, untranslated region.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email jmcuezva@cbm.uam.es).

RNABPs (RNA-binding proteins) of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase mRNA ( $\beta$ -mRNA) have been shown to exert a relevant role in the control of translation of the mRNA both in development [14] and in carcinogenesis [18,21].

Down-regulation of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase and the suppression of the bioenergetic activity of mitochondria is a required event to promote *in vivo* tumour progression in colon cancer [22]. In fact, we have recently demonstrated [22] that tumour xenografts derived from three isogenic HCT116 colon cancer cell lines differing in the expression level of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase only develop when cells with the highly glycolytic phenotype are selected, i.e. tumour development requires the selection of cancer cells with a repressed biogenesis and functional activity of mitochondria. In other words, cancer cells with a functional activity of mitochondria are unable to develop tumours [22]. Importantly, such tumours displayed the transcriptomic, proteomic and mitochondrial ultrastructure of the cells treated with OL (oligomycin) [22]. These findings strongly emphasized the relevance of the cancer cell microenvironment for tumour progression, further suggesting that cells treated with OL [22] could provide a model to unveil the mechanisms involved in the acquisition of the malignant phenotype. In the present study, we have addressed the mechanisms and signalling pathways that control the down-regulation of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase in colon cancer cells treated with OL with the purpose of advancing the knowledge of the phenotype that is competent for tumour promotion [22]. The results have uncovered that glycolysis and oxidative phosphorylation are regulated by different mechanisms of gene expression. Moreover, the results highlight the relevance of translational control mediated by the activation of the stress kinases AMPK (AMP-activated protein kinase) [23] and GCN2 [general control non-repressible 2, also called eIF (eukaryotic initiation factor) 2 $\alpha$  kinase] [24,25] to specifically repress the translation of  $\beta$ -mRNA and the promotion of the abnormal bioenergetics of mitochondria in the cancer cell. Overall, we stress that the activation of AMPK and GCN2-ATF4 (activating transcription factor 4) marks the onset of colon cancer progression.

## EXPERIMENTAL

### Cellular treatments and siRNA (small interfering RNA) silencing

Human colorectal carcinoma HCT116 cells were grown at 37°C and 7% CO<sub>2</sub> in McCoy's 5A medium (Sigma) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum. Cells were left untreated (M-type cells) or treated with 6  $\mu$ M OL for 48 h (G-type cells) [22]. Where indicated the cells were incubated with 0.1 mM AICAR (5-amino-4-imidazolecarboxamide 1- $\beta$ -D-ribofuranoside) for 48 h. Transfections of AMPK plasmids [26] were carried out with Lipofectamine™ and Plus™ Reagent (Invitrogen). A plasmid encoding a mitochondrial version of GFP (green fluorescent protein) was co-transfected with the plasmids of interest at a 1:10 ratio to assess transfection efficiencies. The siRNA Qiagen s1702 used to suppress the expression of ATF4 was transfected using siPORT NeoF<sub>x</sub> reagent (Ambion). An inefficient siRNA sequence, Silencer Select Negative Control number 1 plasmid (Ambion), was used as a negative control and the siRNA of GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was used as a positive control. The medium was changed at 24 h post-transfection and cells were analysed at 48 h post-transfection for ATF4 expression.

### Western blots

Cellular pellets were resuspended in lysis buffer (25 mM Hepes, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF and

5  $\mu$ g/ml leupeptin). Extracts were centrifuged at 11000 g for 15 min at 4°C. Protein concentration in the supernatants was determined with the Bradford reagent. Cellular proteins (7–20  $\mu$ g) were fractionated by SDS/PAGE (9% or 15% gels) and then transferred on to PVDF membranes. The primary antibodies used were (dilutions in parentheses): anti- $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase (1:50000) [10]; anti-Hsp60 (heat-shock protein 60) (SPA-807, Stressgen; 1:2000); anti-GAPDH (1:20000) and anti-PK (pyruvate kinase) (1:1000) from Abcam; anti-SDH (succinate dehydrogenase) (1:500), anti-PDH (pyruvate dehydrogenase) (1:500) and anti-COX IV [COX (cytochrome c oxidase) subunit IV] (1:250) from Invitrogen; anti-(COX I) (1:150) and anti- $\alpha$ -F<sub>1</sub>-ATPase ( $\alpha$  catalytic subunit of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase) (1:1000) from Molecular Probes; anti- $\alpha$ -tubulin (1:5000) and anti-LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3 $\alpha$ ) (1:5000) from Sigma; anti- $\beta$ -catenin (1:500) from BD Biosciences; anti-GRK2 (G-protein-coupled receptor kinase 2) (1:500), anti-p53 (1:200), anti-HIF (hypoxia-inducible factor) 1 $\alpha$  (1:150), anti-PGC1 $\alpha$  (peroxisome-proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1 $\alpha$ ) (1:250), anti-p70<sup>S6K</sup> (ribosomal protein S6 kinase, 70 kDa, polypeptide 1) (1:1000), anti-HuR [ELAV (embryonic lethal abnormal vision)-like protein] (1:200), anti-eIF2 $\alpha$  (1:1000) and anti-ATF4 (1:500) from Santa Cruz Biotechnology; anti-Akt (1:1000), anti-p- (phospho-) Akt (1:1000), anti-AMPK (1:1000), anti-p-AMPK (1:1000), anti-p38<sup>MAPK</sup> (mitogen-activated protein kinase 14) (1:1000), anti-mTOR (mammalian target of rapamycin) (1:1,000), anti-p-mTOR (1:1000), anti-4EBP1 (eIF4E-binding protein 1) (1:1000), anti-p-4EBP1 (1:1000), anti-p-p70<sup>S6K</sup> (1:1000), anti-p-eIF2 $\alpha$  (1:1000), anti-p-GCN2 (1:2000), anti-p-raptor (regulatory-associated protein of mTOR) (1:1000), anti-p-S6 (1:1000), anti-p-ACC (acetyl-CoA carboxylase) (1:1000), anti-ULK1 (unc-51-like kinase 1) Ser<sup>555</sup> (1:1000 dilution) and anti-ULK1 Ser<sup>758</sup> (1:1000) from Cell Signaling Technology; anti-GCN2 (1:2000) [27] and anti-c-Myc (1:400) from Roche Applied Science; and anti-p62 (sequestosome 1) (1:1000) from Enzo Life Sciences. Secondary goat anti-rabbit, rabbit anti-goat and rabbit anti-mouse antibodies (1:5000) were used for detection using a chemiluminescence detection method [ECL (enhanced chemiluminescence), Invitrogen]. Membranes were exposed to X-ray films. Quantification of the immunoreactive bands [a.u. (arbitrary units)] was accomplished using a Kodak DC120 Zoom digital camera and the Kodak 1D Image Analysis Software for Windows.

### qRT-PCR (quantitative real-time PCR) analysis

RNA samples were extracted from the cells using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Total RNA samples were quantified using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer. RNA integrity was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyser. RT (reverse transcription) reactions were performed using 1  $\mu$ g of total RNA and the High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) with random primers. Primers were designed with Probe Finder Software (Roche Applied Science). The primers used were:  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase-F (forward): 5'-CAGCAGATTTTGGCAGGTG-3',  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase-R (reverse): 5'-CTTCAATGGGTCCCACCATA-3'; Hsp60-F: 5'-TGCTATGGCTGGAGATTTTGT-3', Hsp60-R: 5'-CAGCAGCATCCAATAAAGCA-3'; GAPDH-F: 5'-AGCCA-CATCGCTCAGACAC-3', GAPDH-R: 5'-GCCCAATACGACCAATCC-3'; G3BP1 (GTPase-activating protein-binding protein 1)-F: 5'-CTTTGGTGGGTTTGTCACTG-3', G3BP1-R: 5'-TGCTGTCTTTCTTCAGGTTCC-3'; LC3-F: 5'-CGCACC-TTCGAACAAAGAG-3', LC3-R: 5'-CTCACCCCTGTATCGT-TCTATATCA-3'; 18S-F: 5'-GCAATTATCCCCATGAACG-3', 18S-R: 5'-GGGACTTAATCAACGCAAGC-3'; ATF4-F:

5'-TCTCCAGCGACAAGGCTAA-3', ATF4-R: 5'-CAATCTG-TCCCGGAGAAGG-3'. qRT-PCR was performed using Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and a LightCycler<sup>®</sup> 2.0 Real-Time PCR System (Roche Applied Science). The relative expression of the mRNAs was determined using the comparative  $\Delta\Delta C_T$  method with GAPDH, G3BP1 or 18S (18S rRNA) as controls.

#### Determination of mtDNA (mitochondrial DNA) copy number

Cellular DNA [nDNA (nuclear DNA) + mtDNA] was extracted from cells ( $4 \times 10^5$ ) using the High Pure PCR Template Preparation Kit from Roche. Quantification of mtDNA (mtDNA/nDNA) was performed by qRT-PCR using the LightCycler<sup>®</sup> 2.0 Real-Time PCR System using 5 ng of DNA, 0.5  $\mu$ M primers and the PCR reaction mixture LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche Applied Science). The nuclear ATP5B and the mitochondrial 12S rRNA-encoded genes were chosen to determine the ratio of mtDNA to nDNA. The primers used were: 12S-F, 5'-CCCAGGGTTGGTCAATTC-3'; 12S-R, 5'-CTTTACGCCGGCTTCTATTG-3'; h $\beta$ -F, 5'-CAGCAGAT-TTTGGCAGGTG-3'; and h $\beta$ -R, 5'-CTTCAATGGGTCCCA-CCATA-3'. The relative mtDNA copy number was calculated using the  $\Delta\Delta C_T$  method and the 12S/h $\beta$  ratio was used to compare the samples.

#### Metabolic labelling and immunoprecipitation

For pulse experiments, cells ( $\sim 10^5$ ) were incubated for 20 min in cysteine/methionine-free medium. Metabolic labelling was initiated by addition of an aliquot (0.7  $\mu$ l) of culture medium supplemented with 0.65 mCi of [<sup>35</sup>S]methionine/ml. After 30–45 min, the radioactive medium was removed and the cells were washed three times with PBS containing 5 mM methionine and cysteine. Cellular pellets were resuspended in RIPA buffer (0.5 M NaCl, 2% Triton X-100, 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, 0.2% SDS and 1% sodium deoxycholate) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche) and freeze–thawed three times. Protein concentration was determined using the Bradford reagent. The radioactivity incorporated into TCA (trichloroacetic acid)-precipitable protein was determined [15]. Immunoprecipitations were carried out from 100  $\mu$ g of protein obtained from cellular extracts using Protein G–Sepharose pre-coated with 6–7.5  $\mu$ g of the IgGs of the following monoclonal antibodies: anti-Hsp60 (clone 17/9-15 G1), anti- $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase (clone 11/21-7 A8), anti-PK (clone 1415-21/24) or anti-GAPDH (clone 273A-E5) [28]. Pre-coating of Protein G–Sepharose was carried out overnight at 4°C in 1 ml of RIPA buffer supplemented with 5 mg of BSA. After formation of the immune complexes, the resin was washed [21] and the immunoprecipitated material was resuspended in 1  $\times$  SDS/PAGE sample buffer and loaded on to an SDS/9% PAGE gel. Gels were processed further for fluorography and exposed to X-ray films.

#### Determination of adenine nucleotides

Approximately  $10^7$  cells were scraped off the plates into PBS. Cells were precipitated and extracted with 500  $\mu$ l of a 6% perchloric acid solution. After centrifugation at 15000 *g* to remove cell debris, the resulting supernatants were neutralized with 2% KOH and freeze-dried. Determination of the cellular content of ATP, ADP and AMP was carried out by standard enzymatic procedures.

#### Immunofluorescence microscopy

Cells were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde for 20 min and processed for immunofluorescence. The primary antibody used was rabbit anti-LC3 antibody from Sigma (1:100 dilution). After three PBS rinses, the cells were incubated for 1 h in the dark with anti-(rabbit IgGs) conjugated to Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 (1:1000 dilution). Cellular fluorescence was analysed by confocal microscopy using a  $\times 63$  1.4 NA (numerical aperture) Plan Apocromat oil objective.

#### Glycolysis and cellular respiration

Lactate concentrations in the culture medium were enzymatically determined as an index of glycolysis [22]. Oxygen consumption rates were determined in an XF24 Extracellular Flux Analyser (Seahorse Bioscience). Cells were seeded in the microplates, treated as indicated and incubated at 37°C and 7% CO<sub>2</sub> for 48 h. The final concentration and order of injected substances was 6  $\mu$ M OL, 0.75 mM DNP (2,4-dinitrophenol), 1  $\mu$ M rotenone and 1  $\mu$ M antimycin [13].

#### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using a two-tailed Student's *t* test. Results shown are means  $\pm$  S.E.M. The number of experiments is indicated. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

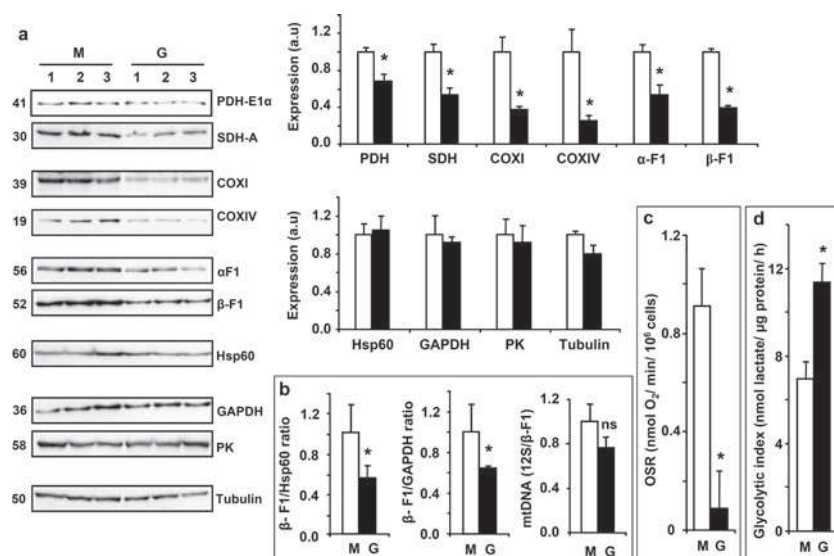
#### OL treatment represses the bioenergetic phenotype of mitochondria

Comparative transcriptomic analysis of HCT116 cells treated (G) or non-treated (M) with OL suggested a global repression of the metabolic and bioenergetic function of mitochondria in G-cells [22]. The results in Figure 1(a) indicate that G-cells have a diminished complement of PDH-E1 $\alpha$ , SDH-A, subunits I (mtDNA-encoded) and IV (nDNA-encoded) of COX, and subunits  $\alpha$  and  $\beta$  of the H<sup>+</sup>-ATP synthase when compared with non-treated M-cells. These changes occurred in the absence of relevant changes in the cellular content of the structural mitochondrial protein Hsp60 and in the abundance of the glycolytic markers GAPDH and PK (Figure 1a). Therefore both the mitochondrial activity ( $\beta$ -F<sub>1</sub>/Hsp60 ratio) and overall mitochondrial potential of OL-treated cells as assessed by its bioenergetic signature ( $\beta$ -F<sub>1</sub>/GAPDH ratio) [4], were significantly diminished when compared with controls (Figure 1b). Interestingly, these changes also occurred in the absence of relevant changes in mtDNA copy number (Figure 1b). Consistent with the enzymatic phenotype displayed, G-cells had a lower activity of oxidative phosphorylation [OSR (OL-sensitive respiratory rate) in Figure 1c] and an increased flux of lactate production (Figure 1d).

#### Inhibition of protein synthesis hampers the bioenergetic differentiation of mitochondria

Quantification by qRT-PCR of the cellular content of the mRNAs encoding  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase and GAPDH illustrated the lack of relevant differences in the abundance of these transcripts between M- and G-cells (Figure 2a). A slight, but significant, 15% reduction in Hsp60 mRNA levels was observed in G-cells (Figure 2a) although this difference had no impact on protein expression (Figure 1a).





**Figure 1** Oligomycin treatment represses the bioenergetic function of mitochondria

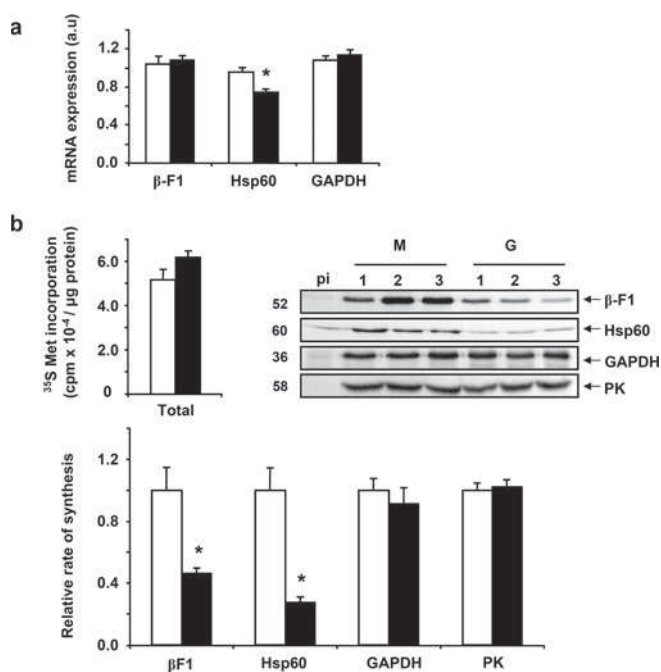
HCT116 cells were incubated with OL (closed bars, G) or left untreated (open bars, M) to promote changes in the bioenergetic phenotype. **(a)** Representative Western blots of the expression of PDH-E1 $\alpha$ , SDH-A, COX I, COX IV,  $\alpha$ -F<sub>1</sub>-ATPase,  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase, Hsp60, GAPDH, PK and tubulin in three different preparations (lanes 1–3) of M- and G-cells. **(b)** Mitochondrial ( $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase/Hsp60) and cellular ( $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase/GAPDH) normalized expression of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase relative mtDNA copy number (12S/ $\beta$ -F<sub>1</sub> ratio). In **(a)** and **(b)**, histograms show the quantification of the bands normalized to the mean value in control M-cells. **(c)** and **(d)** Rates of OL-sensitive respiration and of lactate production respectively. Results are means  $\pm$  S.E.M. for at least three determinations. \* $P < 0.05$  compared with M-cells by Student's  $t$  test; ns, not significant. The molecular mass of each protein in kDa is indicated on the left-hand side of the blot.

These findings indicate that down-regulation of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase in G-cells (Figure 1a) could not be ascribed to a limited activity of the transcription of the gene encoding ATP5B or to a regulatory event affecting the abundance of its mRNA. Rather, the results suggest that  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase expression is being controlled at the level of mRNA translation.

To confirm this idea, we studied the initial rates of protein synthesis after a short time-pulse of [<sup>35</sup>S]methionine in M- and G-cells. We observed no significant differences in the overall rate of protein synthesis between M- and G-cells (Figure 2b). However, the results showed a significant 2–3-fold reduction in the relative rate of synthesis of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase and Hsp60, the two nuclear-encoded mitochondrial proteins, in G-cells (Figure 2b). In contrast, the relative rates of synthesis of the two glycolytic proteins were no different when compared with M-cells (Figure 2b). These findings indicate that the switch from the M- to the G-phenotype of colon cancer HCT116 cells [22] involves the specific repression of the translation of the mRNAs encoding mitochondrial proteins. In this regard, reanalysis of the transcriptomic study carried out to compare M- and G-cells [22] further indicated a highly significant (Benjamini  $P$  value of  $5.4 \times 10^{-5}$ ) repression of the expression of a large number of the mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases in G-cells. The lack of changes observed in Hsp60 expression in G-cells (Figure 1a) despite a significant reduction in its initial rate of synthesis (Figure 2b) further suggests the participation of mechanisms operating at the level of protein turnover.

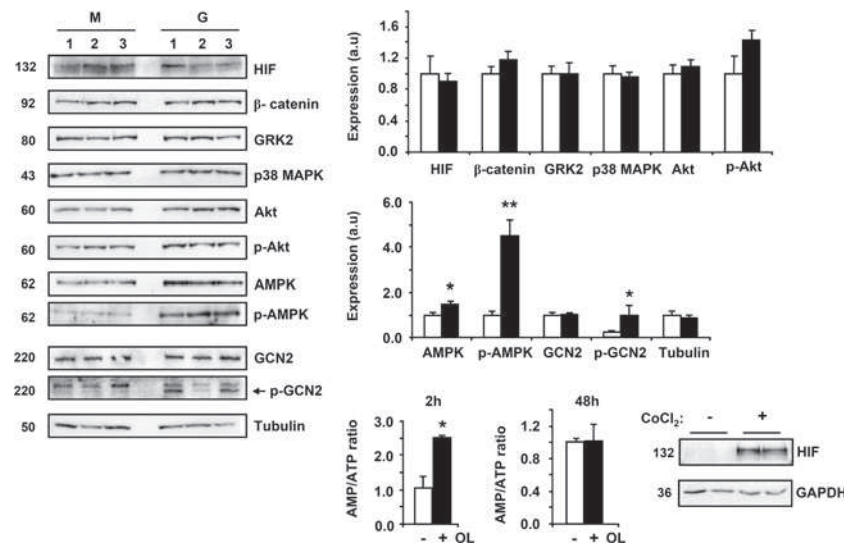
### Cellular adaptive response to OL treatment

Next, we monitored some of the relevant signalling pathways that are involved in the control of cell proliferation, survival and invasion and that might participate in the repression of the bioenergetic function of mitochondria. Interestingly, we found that HIF1 $\alpha$  was not differentially expressed in G-cells when compared with M-cells (Figure 3), consistent with the observation



**Figure 2** Translational control hampers the bioenergetic function of mitochondria

HCT116 cells were incubated with OL (closed bars, G) or left untreated (open bars, M). **(a)** Cellular RNA was extracted and the relative mRNA abundance of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase ( $\beta$ -F<sub>1</sub>), Hsp60 and GAPDH was determined by qRT-PCR. Results are means  $\pm$  S.E.M. for three experiments. **(b)** Determination of the *in vivo* rate of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase, Hsp60, GAPDH and PK synthesis in M- and G-cells after metabolic labelling with [<sup>35</sup>S]methionine followed by immunoprecipitation. The radioactivity incorporated into TCA-precipitable protein (Total) was determined. Histograms show the mean  $\pm$  S.E.M. of the quantification of the bands normalized to the mean value in control cells for three to six different preparations. Pi, non-specific immunoglobulin. \* $P < 0.05$  compared with M-cells by Student's  $t$  test. The molecular mass of each protein in kDa is indicated on the left-hand side of the blot.



**Figure 3** Cellular adaptive response to energetic stress involves the activation of AMPK and GCN2

HCT116 cells were incubated with OL (closed bars, G) or left untreated (open bars, M). Representative Western blots of the expression of HIF1 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin, GRK2, p38<sup>MAPK</sup>, Akt, p-Akt, AMPK, p-AMPK, GCN2, p-GCN2 and tubulin for three different preparations (lanes 1–3) of M- and G-cells. Histograms show the quantification of the bands normalized to the mean value in control M-cells. Results are the means  $\pm$  S.E.M. for at least three determinations. The AMP/ATP ratio was determined in M-cells after 2 h or 48 h of treatment with OL and normalized to the mean value in untreated cells; results are means  $\pm$  S.E.M. for nine determinations. HCT116 cells incubated with 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> for 6 h reveal the induction of HIF1 $\alpha$ , a positive control to verify the specificity of the antibody used in the present study. \* $P$  < 0.05 and \*\* $P$  < 0.001 when compared with M-cells or untreated cells by Student's  $t$  test. The molecular mass of each protein in kDa is indicated on the left-hand side of the blot.

that OL blocks HIF1 $\alpha$  expression [29]. Similar results were obtained for  $\beta$ -catenin, GRK2, p38<sup>MAPK</sup> and for both the total and phosphorylated forms of the serine/threonine kinase Akt (Figure 3). Notably, we found significant differences in the expression of the stress kinases AMPK and GCN2 supporting the activation of these pathways in cells with the G-phenotype (Figure 3). Indeed, both the total and phosphorylated forms of AMPK were augmented in G- when compared with M-cells (Figure 3). Consistent with the activation of AMPK, we observed an increased cellular AMP/ATP ratio after short-term (2 h) treatment of HCT116 cells with OL. Interestingly, the AMP/ATP ratio was not significantly different between M- and G-cells after 48 h of treatment (Figure 3). In the case of the GCN2 kinase, only the phosphorylated active form of the protein was augmented in cells with the G-phenotype (Figure 3).

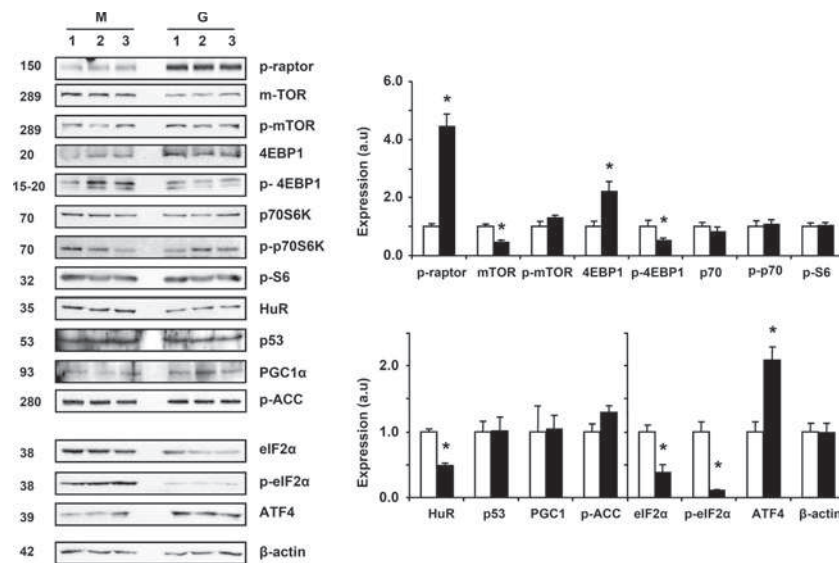
#### Downstream targets of AMPK and GCN2

AMPK is a master protein kinase that regulates cell metabolism [23] and controls the activity of essential mediators of the cellular adaptive response, such as p53, HuR and mTOR. Consistent with the activation of AMPK in G-cells, we observed a large phosphorylation of raptor (Figure 4) together with the down-regulation of the cellular content of mTOR and HuR in the absence of relevant changes in p53 when compared with M-cells (Figure 4). Interestingly, ACC, a well-established target of AMPK that is phosphorylated and inhibited upon AMPK activation, was not affected in G-cells (Figure 4), indicating the relevance that the synthesis of lipids has as a pathway to allow cellular proliferation in colon cancer cells. The serine/threonine kinase mTOR controls translation and autophagy [30]. In agreement with the lesser signalling through mTOR, we observe an increase in the total cellular content of the cap-dependent translation repressor 4EBP1 [31] in G-cells (Figure 4). The content of the phosphorylated form of 4EBP1 was also diminished in G-

cells (Figure 4), further supporting the sequestration of the rate-limiting eIF4E [32]. On the other hand, and to our surprise, other downstream targets of mTOR, such as p70<sup>S6K</sup>, its phosphorylated form (p-p70S6K) and that of its target the ribosomal protein S6 (p-S6), and of the transcription co-activator PGC1 $\alpha$ , revealed no significant changes between both cellular phenotypes (Figure 4). Likewise, and consistent with the activation of GCN2 in G-cells (Figure 3), we observed a significant increase in the cellular content of the transcription factor ATF4 when compared with M-cells (Figure 4). It is well established that GCN2 represses translation via phosphorylation of eIF2 $\alpha$  and the subsequent up-regulation of the translation of ATF4 [38]. However, in the present study the content of both eIF2 $\alpha$  and its phosphorylated form was significantly down-regulated (Figure 4), suggesting feedback inhibition of the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  after long-term (48 h) activation of GCN2. Overall, these results strongly suggest that a major point of regulation for promoting the repression of the bioenergetic function of mitochondria in G-cells is exerted at the level of translation by activation of the AMPK and GCN2 stress kinases.

#### Autophagy is enhanced in G-cells

The phosphorylation of raptor (Figure 4) and of Ser<sup>555</sup> of the autophagy initiator kinase ULK1 (Figure 5a) suggested the AMPK-mediated inhibition of the mTOR signalling pathway and the subsequent activation of autophagy in cells with the G-phenotype [30]. Consistent with the mTOR-mediated activation of autophagy, we also noted the dephosphorylation of Ser<sup>758</sup> of ULK1 in G-cells (Figure 5a). Interestingly, a significant decrease in the cellular content of the p62 marker of autophagy was noted in G-cells (Figure 5a). Gene expression analysis using the Affymetrix platform also indicated the transcriptional activation of the autophagic *LC3* gene (fold-change increase of 1.7 in G-cells,  $P$  < 0.009 [22]). Quantification of the expression of *LC3*



**Figure 4** Energetic stress triggers significant changes in downstream targets of AMPK and GCN2

HCT116 cells were incubated with OL (closed bars, G) or left untreated (open bars, M). Representative Western blots of the expression of p-raptor, m-TOR, p-mTOR, 4EBP1, p-4EBP1, p70<sup>S6K</sup>, p-p70<sup>S6K</sup>, p-S6, HuR, p53, PGC1 $\alpha$ , p-ACC, eIF2 $\alpha$ , p-eIF2 $\alpha$ , ATF4 and  $\beta$ -actin in three different preparations (lanes 1–3) of M- and G-cells. Histograms show the quantification of the bands normalized to the mean value in control M-cells. Results are means  $\pm$  S.E.M. for three to nine determinations. \* $P$  < 0.05 compared with M-cells by Student's  $t$  test. The molecular mass of each protein in kDa is indicated on the left-hand side of the blot.

mRNA by qRT-PCR showed a significant increase in its cellular content in G-cells when compared with M-cells (Figure 5b). Moreover, Western blot data confirmed that the ratio of the conjugated form of LC3II to LC3I, which is a marker of autophagosome formation, is significantly increased in the G-phenotype (Figure 5b). The higher abundance of autophagosomes in G-cells was further confirmed by immunofluorescence microscopy (Figure 5c). Overall, these findings support that the activation of autophagy is an additional pro-survival strategy of the cancer cell to mediate the phenotypic changes that accompany the acquisition of the tumour-promoting behaviour in response to a bioenergetic stressor.

#### AMPK activation and ATF4 mediate the inhibition of mitochondrial ATP synthesis

To assess the effect of the activation of the AMPK pathway in cellular bioenergetics, we first determined the oxygen consumption rates of HCT116 cells (Figure 6a). The results show a representative experiment of cellular O<sub>2</sub> consumption after the sequential addition of OL, DNP, rotenone and antimycin to the cells, illustrating a normal respiratory response to the inhibition of oxidative phosphorylation (OL), mitochondrial uncoupling (DNP) and the inhibition of respiration in HCT116 cells. Moreover, data in Figure 6(b) indicate the linear response of the MRR (maximum respiratory rate), BRR (basal respiratory rate) and OSR of the cells at increasing numbers. The activation of the AMPK pathway by treating the cells with AICAR, an analogue of AMP that is widely used as an activator of the pathway, promoted a significant decrease in OSR in HCT116 cells concurrently with the phosphorylation of AMPK (Figure 6c). AICAR was used at a concentration of 0.1 mM because titration experiments of its effect on the proliferation of HCT116 cells indicated a high toxicity of the compound above this concentration (results not shown). Moreover, the expression of a constitutively active AMPK mutant ( $\alpha$ 1CA, T172D), which is a truncated version that is not dependent on regulatory subunits to activate

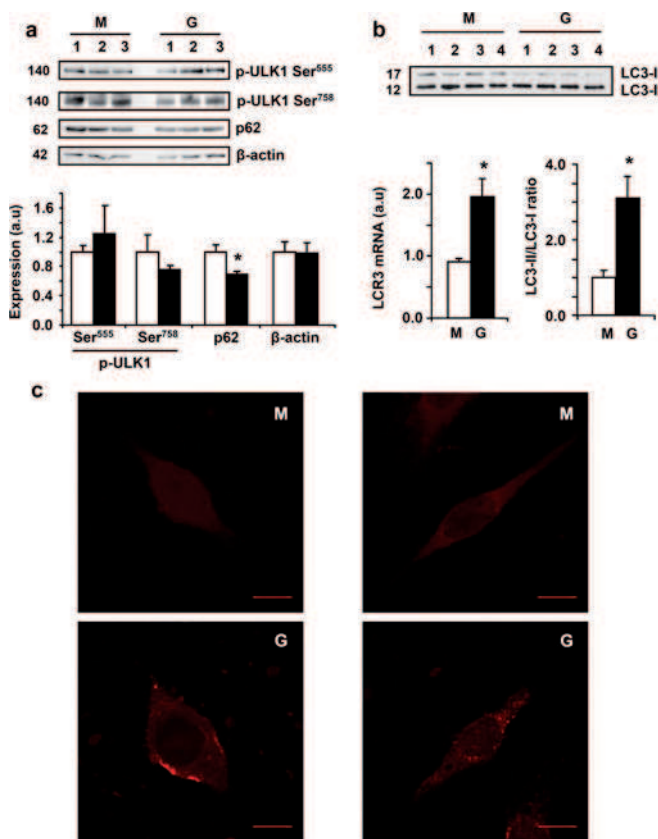
the pathway [26] as revealed by the phosphorylation of AMPK (Figure 6d), also promoted a large inhibition of oligomycin-sensitive respiration when compared with their respective controls (Figure 6d). These findings indicate that activation of AMPK partially hinders the activity of the mitochondrial ATP synthase. Interestingly, and consistent with our previous observation of the lack of changes in p-ACC in G- when compared with M-cells (Figure 4), we show that the overexpression of  $\alpha$ 1CA (Figure 6d) or AICAR treatment (Figure 6c) does not affect the phosphorylation of ACC, stressing the relevance of lipogenesis for proliferation of HCT116 colon cancer cells.

To confirm that activation of AMPK participates in controlling mitochondrial oxidative phosphorylation in colon cancer cells, we next studied the effect of AICAR on the rates of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase synthesis (Figure 7). The results demonstrated that the activation of AMPK significantly reduced the initial rate of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase synthesis in the absence of relevant changes on overall protein synthesis and on the synthesis of Hsp60, GAPDH and PK (Figure 7), indicating that the activation of AMPK participates in the repression of the bioenergetic function of colon cancer mitochondria.

To support the participation of the GCN2–ATF4 pathway in silencing the bioenergetic activity of mitochondria, we determined the effect of silencing ATF4 in cellular respiration of M-cells (Figure 8). The results obtained indicated that 40–60% silencing of ATF4 at both the mRNA and protein levels (Figures 8a and 8b) resulted in a significant increase in oxidative phosphorylation (Figure 8c), also supporting the participation of this pathway in promoting the repression of the bioenergetic activity of mitochondria in colon cancer.

#### DISCUSSION

We have recently documented that colon cancer progression requires the selection of cancer cells with a highly glycolytic phenotype due to the repression of the bioenergetic function of mitochondria [22]. However, the mechanisms and signalling



**Figure 5** Inhibition of mTOR triggers the activation of autophagy

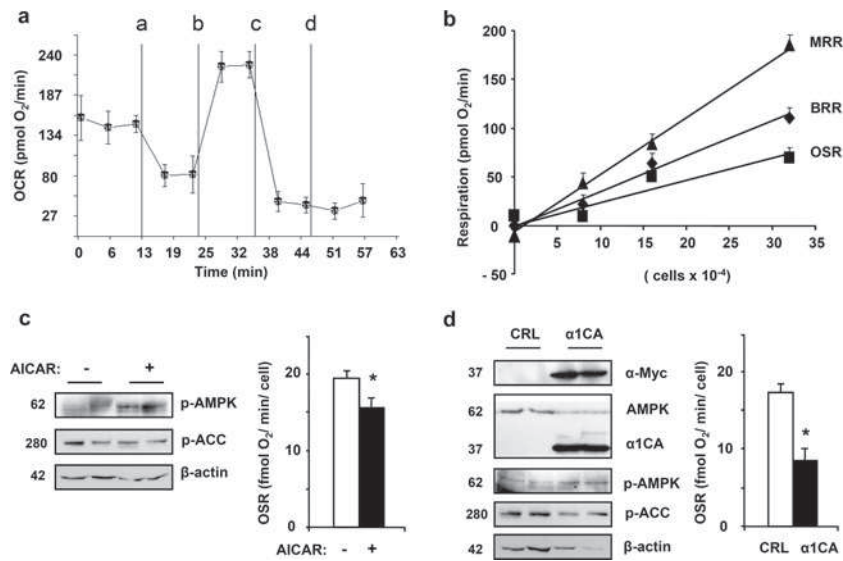
HCT116 cells were incubated with OL (closed bars, G) or left untreated (open bars, M). (a) Representative Western blots of the expression of p-ULK1 Ser<sup>555</sup>, p-ULK1 Ser<sup>758</sup> and p62 in three different preparations (lanes 1–3) of M- and G-cells. Histograms show the quantification of the bands normalized to β-actin and to the mean value in control M-cells. Results are means ± S.E.M. for three determinations. \**P* < 0.05 compared with M-cells by Student's *t* test. (b) Cellular mRNA was extracted and *LC3* mRNA was determined by qRT-PCR. Results are the means ± S.E.M. for three experiments. Analysis of LC3-I and its conjugated LC3-II form in four different preparations (lanes 1–4) of M- and G-cells by Western blotting. The LC3-II/LC3-I ratio was normalized to the mean value in control M-cells and is represented in the histogram. Results are means ± S.E.M. for four determinations. \**P* < 0.05 compared with M-cells by Student's *t* test. (c) Immunofluorescence microscopy of HCT116 cells incubated with OL for 48 h (G, lower panels) or left untreated (M, upper panels), stained with anti-LC3 antibody. Images of G-cells illustrate the presence of autophagosomes (red cytoplasmic immunostaining). Scale bar, 10 μm. The molecular mass of each protein in kDa is indicated on the left-hand side of the blot.

pathways that trigger the down-regulation of β-F<sub>1</sub>-ATPase and hence of mitochondrial oxidative phosphorylation in colon cancer remained to be investigated. Colon cancer cells treated with oligomycin provide a model to decipher the mechanisms and signalling pathways that mediate the acquisition of the metabolic phenotype compatible with tumour progression [22,33].

The results of the present study illustrate that metabolic stress triggered by OL treatment of the cells promotes the persistent activation of the stress kinases AMPK and GCN2 (Figure 9). AMPK is a serine/threonine kinase that regulates energetic metabolism and is activated under conditions that elevate the AMP/ATP ratio, such as glucose deprivation, hypoxia and muscle contraction [34]. AMPK activation triggers important changes in downstream targeted proteins with a wide functional relevance in homeostatic adaptation of the cell, including the regulation of mitochondrial biogenesis [35] and function [36], autophagy [30] and angiogenesis [37]. Consistent with the activation of AMPK in G-cells, we report the phosphorylation of raptor,

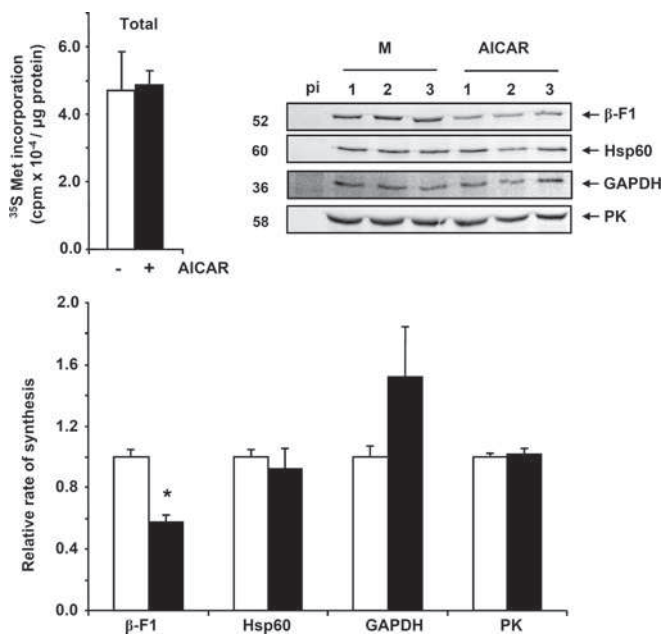
a significant inhibition of mTOR, the subsequent inhibition of the synthesis of mitochondrial proteins and the activation of autophagy (Figure 9). The up-regulation of the expression of genes involved in angiogenesis and vascular development has already been described in G-cells [22]. GCN2 is also a stress kinase activated by nutrient deprivation and viral infection [24,25] that represses the translation of most mRNAs, but selectively increases translation of ATF4 [38]. Consistent with the activation of GCN2, we show that the content of ATF4 is significantly increased in G-cells (Figure 9). It is likely that the co-ordinated activation of AMPK and GCN2 mediate the repression of the translation of nuclear-encoded mRNAs of mitochondria through 4EBP1 and eIF2α respectively (Figure 9). These changes trigger a profound switch in cellular energetic metabolism to an enhanced glycolysis due to a diminished activity of oxidative phosphorylation (Figure 9). Remarkably, we report that, whereas the synthesis and expression of nuclear-encoded mitochondrial proteins is stringently dependent on the activity of cap-dependent translation, that of the enzymes of glycolysis is not affected by interference with this pathway, suggesting the existence of a specific pathway for translation of the mRNAs involved in glycolysis. Owing to the essential cellular function of glycolysis, it is possible that the translation of glycolytic mRNAs shares signalling pathways and mechanisms with the translation of the mRNAs involved in cellular adaptation to stressful conditions [27]. These findings provide the first indication that the mechanisms that control the expression of the enzymes of the two main pathways of energy metabolism (oxidative phosphorylation and glycolysis) are exerted independently and at a different level of regulation of gene expression. In addition, it is likely that metabolic adaptation also involves the participation of additional mechanisms acting at the level of protein turnover. The repression of the bioenergetic function of mitochondria, which is a reversible phenotypic trait of the cancer cell [22], is thus orchestrated by the activation of the stress sensors AMPK and GCN2. In agreement with our findings (Figure 9), the activation of AMPK in colorectal [39] and ovarian [40] carcinomas and the requirement of the GCN2–ATF4 pathway for maintaining metabolic homeostasis and tumour cell survival [38] have been described recently.

Interestingly, the repression of β-F<sub>1</sub>-ATPase expression observed in G-cells is not paralleled by changes in the cellular abundance of its mRNA. In fact, reduced β-F<sub>1</sub>-ATPase expression results from a translation-masking event of β-mRNA in agreement with similar findings observed in human [19] and rat [18] carcinomas. It is tempting to suggest that the diminished expression of other mitochondrial proteins observed in G-cells (Figure 1) could result by regulation of a common and presently unknown factor needed for translation of this particular set of nuclear-encoded mRNAs of mitochondria. Translation masking of β-mRNA during development [14] and in carcinogenesis [18,21,41] is due to the binding of specific RNABPs to the transcript. It has been suggested that regulated interactions within the ribonucleoprotein complex [42] hamper the efficient translation of β-mRNA [4]. Moreover, protein binding to β-mRNA was shown to depend on a low energy and oxidized state of the cell [43]. Consistent with these findings, it is possible that the increase in the AMP/ATP ratio observed in the short term after treatment of the cells with OL could mediate the rapid silencing of β-mRNA by favouring the binding of repressor proteins on to the transcript (Figure 9). In fact, AMPK activity has been correlated with the activity of some RNABPs such as HuR [44], a relevant RNABP involved in post-transcriptional regulation of gene expression that interacts with the 3'UTR of β-mRNA [41]. In agreement with recent findings [33], we observed that the activation of glycolysis in response to OL



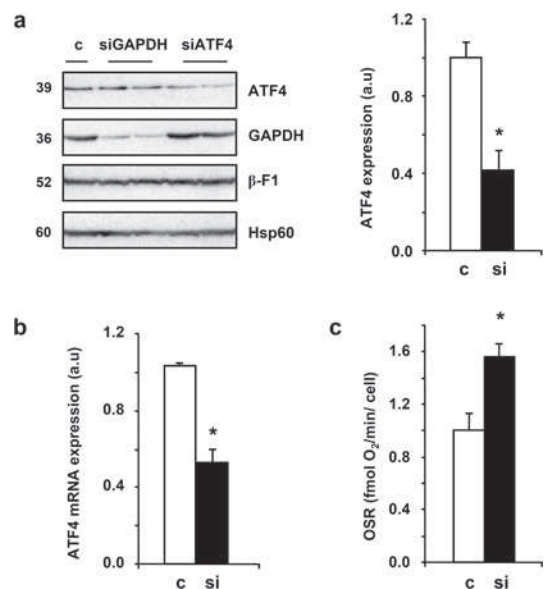
**Figure 6** AMPK activation promotes the inhibition of oxidative phosphorylation

HCT116 cells were seeded at various densities in microplates. (a) Oxygen consumption rates (OCR) after the sequential addition of OL (a), DNP (b), rotenone (c) and antimycin (d) to the cells. (b) Linear response of the BRRs, OSRs and MRRs (DNP-induced) at various cell densities. (c) Incubation of M-cells with 0.1 mM AICAR promoted a significant decrease in OSR (closed bars) when compared with untreated cells (open bars). Results are means  $\pm$  S.E.M. for three experiments. Representative Western blots of the expression of p-AMPK and p-ACC are shown. (d) Expression of a constitutively active AMPK mutant ( $\alpha$ 1CA), as revealed by Western blotting with either anti-Myc tag or anti-AMPK antibody, promotes a large inhibition of OSR (closed bar) when compared with control (CRL) GFP-transfected cells (open bar). Results are means  $\pm$  S.E.M. for three experiments. \* $P < 0.05$  compared with control cells by Student's  $t$  test. Representative Western blots of the expression of p-AMPK and p-ACC are shown. The molecular mass of each protein in kDa is indicated on the left-hand side of the blot.



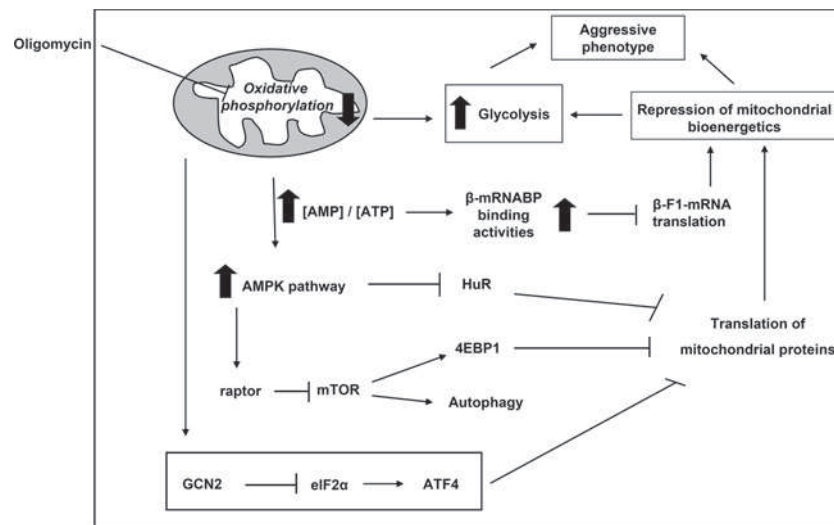
**Figure 7** AMPK activation inhibits  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase synthesis

HCT116 cells were incubated with 0.1 mM AICAR (closed bars) or left untreated (open bars). Determination of the *in vivo* rate of  $\beta$ -F<sub>1</sub>, Hsp60, GAPDH and PK synthesis in AICAR-treated and untreated cells after metabolic labelling with [<sup>35</sup>S]methionine followed by immunoprecipitation. The radioactivity incorporated into TCA-precipitable protein (Total) was determined. Histograms show the mean  $\pm$  S.E.M. of the quantification of the bands normalized to the mean value in control cells from three different preparations (lanes 1–3). pi, non-specific immunoglobulin. \* $P < 0.05$  when compared with untreated cells by Student's  $t$ -test. The molecular mass of each protein is indicated on the left hand side of the blot.



**Figure 8** Silencing of ATF4 promotes the bioenergetic function of mitochondria

(a) Cellular lysates of control (c), GAPDH-silenced (siGAPDH, also used as control) and ATF4-silenced (siATF4) cells were analysed by Western blotting for the expression of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase ( $\beta$ -F<sub>1</sub>), Hsp60, GAPDH and ATF4. Histograms show the quantification of the bands normalized to the mean value in control cells. (b) Cellular mRNA was extracted from control and ATF4-silenced (si) cells and ATF4 mRNA was determined by qRT-PCR. (c) Silencing of ATF4 mediates a large increase in OSR when compared with control cells. Results are means  $\pm$  S.E.M. for three (b) or five (c) experiments. \* $P < 0.05$  compared with control cells by Student's  $t$  test. The molecular mass of each protein in kDa is indicated on the left-hand side of the blot.



**Figure 9** Schematic diagram illustrating the major signalling pathways and mediators involved in the acquisition of the tumour-promoting phenotype in colon cancer cells

Energetic stress triggered by the inhibition of oxidative phosphorylation with oligomycin promotes short-term changes in the AMP/ATP ratio and in the rates of glycolysis. Moreover, OL treatment promotes the persistent activation of the AMPK and GCN2 pathways. Activation of AMPK phosphorylates raptor and represses mTOR and HuR expression with further consequences in the augmented expression of 4EBP1 and the induction of autophagy. The activation of GCN2 co-operates with AMPK in down-regulating cap-dependent translation through eIF2 $\alpha$ . Overall, all of these changes affect, in the short or long term, the synthesis of mitochondrial proteins, specifically  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase. As a consequence, mitochondrial activity is repressed, enhancing glycolysis and the acquisition of the tumour-promoting phenotype of colon cancer cells.

treatment provides enough ATP to recover a normal AMP/ATP ratio at long-term. Hence it is likely that the persistent activation of AMPK observed in G-cells after 48 h of OL treatment is being mediated by additional regulators of the bioenergetically stressed cell.

AMPK activation is related to an increased mitochondrial biogenesis in muscle and endothelial cells through transcriptional regulation mediated by the PGC1 $\alpha$ /NRF (nuclear respiratory factor)/Tfam (transcription factor A, mitochondrial) pathway [3,35]. However, we do not observe changes in the expression of PGC1 $\alpha$  in colon cancer stressed cells. In fact, our results indicate that the persistent activation of AMPK in stressed cells results in the repression of the bioenergetic differentiation of mitochondria by mechanisms controlled at the level of translation. This repression is most probably mediated through 4EBP1 for transcripts encoded in nuclear genes and by a lower expression of the mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases for the transcripts encoded in mtDNA. A general belief is that the activation of AMPK and the inhibition of mTOR are cytotoxic to cancer cells [32,45]. However, we observed that persistent activation of AMPK and the inhibition of mTOR are required to establish the tumour-promoting phenotype of colon cancer cells by repression of the bioenergetic function of mitochondria [22]. In this regard, and consistent with our observations, it has been described that the inhibition of the mTOR pathway down-regulates mitochondrial oxygen consumption and the ATP synthetic capacity [36]. In agreement with this, we show that AICAR treatment or the overexpression of a constitutively active mutant of AMPK, resulted in diminished ATP synthetic capacity and the inhibition of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase synthesis. These findings strongly support that the activity of the mTOR pathway is essential for maintaining the bioenergetic function of mitochondria [36] and specifically of the synthesis of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase. Within this framework, and in contrast with the beneficial effects of targeting mTOR in cancer [32,45,46], our results raise a reasonable argument against therapies targeting the activation of AMPK and the inhibition

of mTOR for the treatment of colon cancer. In agreement with our observation, it has been described that the inhibition of AMPK sensitizes cancer cells to chemotherapy [47]. It is likely that these differences in cell response might stem from cell-type-specific changes in the mechanisms that regulate the biogenesis and function of mitochondria [3].

AMPK and GCN2 are activated by stress signalling, such as glucose deprivation, hypoxia and starvation of amino acids [24,25,34]. Interestingly, none of these stimuli, including hypoxia, seem to operate in our model. However, it is remarkable that the energetic stress that activated AMPK in G-cells is very similar from a mechanistic viewpoint to the HIF-independent hypoxia-induced energy stress that activates mechanisms of energy conservation to promote survival under stressful conditions [48]. In this regard, we suggest that a product of mitochondrial metabolism, such as ROS, could act as a signalling metabolite to maintain the cellular stress and the persistent activation of AMPK [49] and GCN2. The scenario where small molecules define the cellular energy status offer a very attractive hypothesis to explain the mitochondrial phenotype and its short-term adaptive response upon changes in the metabolic condition of the cell. In this regard, we show that in response to energy stress the autophagic pathway is activated in G-cells, perhaps as a strategy to eliminate the damaged proteins produced during adaptation to stress in order to optimize the limited energy supplies [30]. We show that the activation of the GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is involved in minimizing the bioenergetic function of mitochondria, allowing G-cells to conserve resources and the reconfiguration of gene expression to manage the energetic stress imposed, leading to the activation of glycolysis as alternative energy provision pathway (Figure 9). In this regard, our results provide the first demonstration illustrating the implication of this pathway to control the stress response when the mitochondrial bioenergetic function is impeded. Consistent with this, we show that the silencing of ATF4 restores the bioenergetic function of mitochondria.

Overall, we conclude that persistent activation of AMPK and GCN2 regulates the balance between glycolysis and aerobic metabolism, specifically repressing the translation of nuclear-encoded mitochondrial proteins. Activation of these signalling pathways is essential to implement a successful response that could allow cancer cells to survive under metabolic stress. Finally, our results open new insights in the pathways involved in the acquisition of a tumour promoter phenotype that implies a deregulated mitochondrial function, highlighting the importance that the organelle has as a tumour suppressor.

#### AUTHOR CONTRIBUTION

Inmaculada Martínez-Reyes and María Sánchez-Aragó carried out experiments. Inmaculada Martínez-Reyes, María Sánchez-Aragó and José Cuezva contributed to the analysis of the data. Inmaculada Martínez-Reyes and José Cuezva designed experiments and wrote the paper. All authors read and approved the final version of the paper.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr J.J. Berlanga, Dr D. Carling, Dr D. Carmena, Dr C. De Haro and Dr A. Woods for helpful discussions and suggestions, and for providing various reagents. We also thank F. Carrasco, M. Chamorro and C. Núñez de Arenas for their help with qRT-PCRs and expert technical assistance.

#### FUNDING

This work was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia [grant number BFU2010-18903], the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) del ISCIII, and the Comunidad de Madrid [grant number S2010/BMD-2402]. The Centro de Biología Molecular Severo Ochoa receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces. I.M.-R. is the recipient of a pre-doctoral fellowship from Junta para la Ampliación de Estudios (JAE)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

#### REFERENCES

- Cuezva, J. M., Ortega, A. D., Willers, I., Sanchez-Cenizo, L., Aldea, M. and Sanchez-Arago, M. (2009) The tumor suppressor function of mitochondria: translation into the clinics. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 1145–1158
- Wallace, D. C. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 359–407
- Scarpulla, R. C. (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol. Rev.* **88**, 611–638
- Willers, I. M. and Cuezva, J. M. (2011) Post-transcriptional regulation of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase: a key regulator of the metabolic phenotype in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 543–551
- Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase: a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717–749
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674
- Bissell, M. J. and Hines, W. C. (2011) Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* **17**, 320–329
- DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. and Thompson, C. B. (2008) The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* **7**, 11–20
- Lopez-Rios, F., Sanchez-Arago, M., Garcia-Garcia, E., Ortega, A. D., Berrendero, J. R., Pozo-Rodriguez, F., Lopez-Encuentra, A., Ballestin, C. and Cuezva, J. M. (2007) Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res.* **67**, 9013–9017
- Cuezva, J. M., Krajewska, M., de Heredia, M. L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J. M., Marusawa, H., Chamorro, M. and Reed, J. C. (2002) The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res.* **62**, 6674–6681
- Shin, Y. K., Yoo, B. C., Chang, H. J., Jeon, E., Hong, S. H., Jung, M. S., Lim, S. J. and Park, J. G. (2005) Down-regulation of mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res.* **65**, 3162–3170
- Sanchez-Arago, M. and Cuezva, J. M. (2011) The bioenergetic signature of isogenic colon cancer cells predicts the cell death response to treatment with 3-bromopyruvate, iodoacetate or 5-fluorouracil. *J. Transl. Med.* **9**, 19
- Sanchez-Cenizo, L., Formentini, L., Aldea, M., Ortega, A. D., Garcia-Huerta, P., Sanchez-Arago, M. and Cuezva, J. M. (2010) Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *J. Biol. Chem.* **285**, 25308–25313
- Izquierdo, J. M. and Cuezva, J. M. (1997) Control of the translational efficiency of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5255–5268
- Izquierdo, J. M., Ricart, J., Ostronoff, L. K., Egea, G. and Cuezva, J. M. (1995) Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J. Biol. Chem.* **270**, 10342–10350
- Tvrđik, P., Kuzela, S. and Houstek, J. (1992) Low translational efficiency of the F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$ -subunit mRNA largely accounts for the decreased ATPase content in brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.* **313**, 23–26
- Martínez-Díez, M., Santamaria, G., Ortega, A. D. and Cuezva, J. M. (2006) Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3'UTRs. *PLoS ONE* **1**, e107
- de Heredia, M. L., Izquierdo, J. M. and Cuezva, J. M. (2000) A conserved mechanism for controlling the translation of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 7430–7437
- Willers, I. M., Isidoro, A., Ortega, A. D., Fernandez, P. L. and Cuezva, J. M. (2010) Selective inhibition of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase mRNA translation in human tumours. *Biochem. J.* **426**, 319–326
- Margeot, A., Blugeon, C., Sylvestre, J., Viallette, S., Jacq, C. and Corral-Debrinski, M. (2002) In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *EMBO J.* **21**, 6893–6904
- Ortega, A. D., Willers, I. M., Sala, S. and Cuezva, J. M. (2010) Human G3BP1 interacts with  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase mRNA and inhibits its translation. *J. Cell Sci.* **123**, 2685–2696
- Sanchez-Arago, M., Chamorro, M. and Cuezva, J. M. (2010) Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis* **31**, 567–576
- Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A. and Hudson, E. R. (2003) Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* **546**, 113–120
- Berlanga, J. J., Santoyo, J. and De Haro, C. (1999) Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase. *Eur. J. Biochem.* **265**, 754–762
- Berlanga, J. J., Ventoso, I., Harding, H. P., Deng, J., Ron, D., Sonenberg, N., Carrasco, L. and de Haro, C. (2006) Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2 $\alpha$  kinase GCN2 against RNA viruses. *EMBO J.* **25**, 1730–1740
- Fryer, L. G., Fougelle, F., Barnes, K., Baldwin, S. A., Woods, A. and Carling, D. (2002) Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem. J.* **363**, 167–174
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **6**, 1099–1108
- Acebo, P., Giner, D., Calvo, P., Blanco-Rivero, A., Ortega, A. D., Fernandez, P. L., Roncador, G., Fernandez-Malave, E., Chamorro, M. and Cuezva, J. M. (2009) Cancer abolishes the tissue type-specific differences in the phenotype of energetic metabolism. *Transl. Oncol.* **2**, 138–145
- Gong, Y. and Agani, F. H. (2005) Oligomycin inhibits HIF-1 $\alpha$  expression in hypoxic tumor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, C1023–C1029
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. (2005) Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 596–603
- Brunn, G. J., Hudson, C. C., Sekulic, A., Williams, J. M., Hosoi, H., Houghton, P. J., Lawrence, Jr, J. C. and Abraham, R. T. (1997) Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* **277**, 99–101
- Silvera, D., Formenti, S. C. and Schneider, R. J. (2010) Translational control in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 254–266
- Hao, W., Chang, C. P., Tsao, C. C. and Xu, J. (2010) Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization. *J. Biol. Chem.* **285**, 12647–12654
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. and Hardie, D. G. (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* **1**, 15–25
- Jeninga, E. H., Schoonjans, K. and Auwerx, J. (2010) Reversible acetylation of PGC-1 $\alpha$ : connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. *Oncogene* **29**, 4617–4624
- Schieke, S. M., Phillips, D., McCoy, Jr, J. P., Aponte, A. M., Shen, R. F., Balaban, R. S. and Finkel, T. (2006) The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J. Biol. Chem.* **281**, 27643–27652

- 37 Ouchi, N., Shibata, R. and Walsh, K. (2005) AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle. *Circ. Res.* **96**, 838–846
- 38 Ye, J., Kumanova, M., Hart, L. S., Sloane, K., Zhang, H., De Panis, D. N., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J. A., Ron, D. and Koumenis, C. (2010) The GCN2–ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* **29**, 2082–2096
- 39 Baba, Y., Noshio, K., Shima, K., Meyerhardt, J. A., Chan, A. T., Engelman, J. A., Cantley, L. C., Loda, M., Giovannucci, E., Fuchs, C. S. and Ogino, S. (2010) Prognostic significance of AMP-activated protein kinase expression and modifying effect of MAPK3/1 in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **103**, 1025–1033
- 40 Buckendahl, A. C., Budczies, J., Fiehn, O., Darb-Esfahani, S., Kind, T., Noske, A., Weichert, W., Sehouli, J., Braicu, E., Dietel, M. and Denkert, C. (2011) Prognostic impact of AMP-activated protein kinase expression in ovarian carcinoma: correlation of protein expression and GC/TOF–MS-based metabolomics. *Oncol. Rep.* **25**, 1005–1012
- 41 Ortega, A. D., Sala, S., Espinosa, E., Gonzalez-Baron, M. and Cuezva, J. M. (2008) HuR and the bioenergetic signature of breast cancer: a low tumor expression of the RNA-binding protein predicts a higher risk of disease recurrence. *Carcinogenesis* **29**, 2053–2061
- 42 Keene, J. D. (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 533–543
- 43 Izquierdo, J. M. and Cuezva, J. M. (2005) Epigenetic regulation of the binding activity of translation inhibitory proteins that bind the 3' untranslated region of  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase mRNA by adenine nucleotides and the redox state. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 481–486
- 44 Wang, W., Fan, J., Yang, X., Furer-Galban, S., Lopez de Silanes, I., von Kobbe, C., Guo, J., Georas, S. N., Foufelle, F., Hardie, D. G. et al. (2002) AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3425–3436
- 45 van Veelen, W., Korsse, S. E., van de Laar, L. and Peppelenbosch, M. P. (2011) The long and winding road to rational treatment of cancer associated with LKB1/AMPK/TSC/mTORC1 signaling. *Oncogene* **30**, 2289–2303
- 46 Janes, M. R., Limon, J. J., So, L., Chen, J., Lim, R. J., Chavez, M. A., Vu, C., Lilly, M. B., Mallya, S., Ong, S. T. et al. (2010) Effective and selective targeting of leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor. *Nat. Med.* **16**, 205–213
- 47 Kim, H. S., Hwang, J. T., Yun, H., Chi, S. G., Lee, S. J., Kang, I., Yoon, K. S., Choe, W. J., Kim, S. S. and Ha, J. (2008) Inhibition of AMP-activated protein kinase sensitizes cancer cells to cisplatin-induced apoptosis via hyper-induction of p53. *J. Biol. Chem.* **283**, 3731–3742
- 48 Liu, L., Cash, T. P., Jones, R. G., Keith, B., Thompson, C. B. and Simon, M. C. (2006) Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol. Cell* **21**, 521–531
- 49 Yun, H., Lee, M., Kim, S. S. and Ha, J. (2005) Glucose deprivation increases mRNA stability of vascular endothelial growth factor through activation of AMP-activated protein kinase in DU145 prostate carcinoma. *J. Biol. Chem.* **280**, 9963–9972

Received 14 October 2011/29 February 2012; accepted 21 March 2012  
Published as BJ Immediate Publication 21 March 2012, doi:10.1042/BJ20111829





## miR-127-5p targets the 3'UTR of human $\beta$ -F1-ATPase mRNA and inhibits its translation

Imke M. Willers, Inmaculada Martínez-Reyes, Marta Martínez-Diez, José M. Cuezva\*

Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 November 2011  
Received in revised form 1 March 2012  
Accepted 2 March 2012  
Available online 10 March 2012

#### Keywords:

Mitochondria  
 $H^+$ -ATP synthase  
Liver  
Translational control  
Human development  
Pathology

### ABSTRACT

The mitochondrial  $H^+$ -ATP synthase is a bottleneck component in the provision of metabolic energy by oxidative phosphorylation. The expression of its catalytic subunit ( $\beta$ -F1-ATPase) is stringently controlled at post-transcriptional levels during oncogenesis, the cell cycle and in development. Here we show that miR-127-5p targets the 3'UTR of  $\beta$ -F1-ATPase mRNA ( $\beta$ -mRNA) significantly reducing its translational efficiency without affecting  $\beta$ -mRNA abundance. Despite the reduced expression of  $\beta$ -F1-ATPase in most human carcinomas, we observed no expression of miR-127-5p in different human cancer cell lines, minimizing the potential role of miR-127-5p as a regulator of the bioenergetic activity of mitochondria in cancer. In contrast, miR-127-5p is highly over-expressed in the human fetal liver. Consistent with previous findings in the rat, the expression of  $\beta$ -F1-ATPase in the human liver also seems to be controlled at post-transcriptional levels during development, what might suggest a role for miR-127-5p in controlling  $\beta$ -mRNA translation and thus in defining the bioenergetic activity of human liver mitochondria. Moreover, immunolocalization techniques and subcellular fractionation experiments using different antibodies against  $\beta$ -F1-ATPase reveal that the ectopic expression of  $\beta$ -F1-ATPase at the cell surface of the hepatocytes and HepG2 cells is negligible or stands for scrutiny.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Mitochondrial activity provides the energy required for adaptation to distinct environmental and physiological conditions of the organism. The mitochondrial  $H^+$ -ATP synthase is the engine used for ATP production by oxidative phosphorylation [1]. Previous studies in yeast and mammalian tissues have shown that the expression of the catalytic subunit of the  $H^+$ -ATP synthase ( $\beta$ -F1-ATPase), which is encoded in the nuclear genome, is mainly regulated by post-transcriptional mechanisms that affect mRNA localization, stability and translation [2–6]. In particular, during development of rat liver [2,7], in brown adipose tissue [8] and in rat [4] and human [9] carcinomas the expression of  $\beta$ -F1-ATPase is regulated at the level of translation. Mechanistically, both during development and in oncogenesis  $\beta$ -F1-ATPase mRNA ( $\beta$ -mRNA) translation is masked by

specific factors that hinder ribosome recruitment onto the mRNA [2,4,10,11]. In this regard, an important *cis*-acting element required for  $\beta$ -mRNA translation is the 3'UTR of the transcript [2–6]. The 3'UTR of  $\beta$ -mRNA acts as a translational enhancer both *in vitro* [2,9,12] and *in vivo* [13], and is essential for the localization [5,6] and efficient translation of the transcript [2,9].

Post-transcriptional control of the expression of specific mRNAs can be explained by the binding of regulatory proteins and/or miRNAs to *cis*-acting elements of the mRNA. Recently, Ras-GAP SH3 binding protein 1 (G3BP1) has been shown to interact with the 3'UTR of  $\beta$ -mRNA to inhibit the initiation step of translation [11] contributing in this way to the observed down-regulation of  $\beta$ -F1-ATPase expression in cancer. On the other hand, miRNAs are important post-transcriptional regulators of gene expression [14]. miRNAs are short, approximately 22-nucleotides long RNAs, that are transcribed as a long primary transcript that folds into a hairpin structure. After nuclear processing, the ~70 nucleotide precursor miRNA (pre-miRNA) is exported to the cytoplasm and processed by Dicer into miRNA duplexes. One strand of the duplex represents the mature miRNA that has to be incorporated into a miRNA-induced silencing complex (RISC) to exert its biological function [14]. miRNAs regulate various biological processes including developmental timing, cell fate determination, apoptosis and metabolism [15–17]. Changes in the expression of miRNAs are associated with human pathology including cancer [14,18–21]. Animal miRNAs regulate gene expression by

**Abbreviations:**  $\beta$ -  $\alpha$ - and  $\gamma$ -F1-ATPase, subunits  $\beta$ ,  $\alpha$  and  $\gamma$  of the mitochondrial  $H^+$ -ATP synthase;  $\beta$ - and  $\gamma$ -mRNA, mRNAs of subunits  $\beta$ - and  $\gamma$ -F1-ATPase; G3BP1, Ras-GAP SH3 binding protein 1; GFP, green fluorescent protein; SDH-B, succinate dehydrogenase subunit B; 3'UTR, 3' untranslated region; ERR $\gamma$  and ERR $\alpha$ , estrogen receptor gamma and alpha transcription factors; PGC-1 $\alpha$ , Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; ATP5B,  $\beta$ -F1-ATPase gene

\* Corresponding author at: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 196 4618; fax: +34 91 196 4420.

E-mail address: [jmcuezva@cibm.uam.es](mailto:jmcuezva@cibm.uam.es) (J.M. Cuezva).

imperfectly base pairing to the 3'UTR of target mRNAs inhibiting protein synthesis or inducing the degradation of the targeted mRNA [22]. However, it has also been reported that some miRNAs can induce translation of the target mRNA [23–25].

Due to the relevant implication of  $\beta$ -F1-ATPase in cell biology and in human pathology [10,26] the aim of this study was to identify miRNAs that might be involved in post-transcriptional control of  $\beta$ -F1-ATPase expression. For this purpose we generated stable cell lines expressing GFP fused to the 3'UTR of human  $\beta$ -mRNA and searched for potential miRNA that can modify the fluorescence intensity of the cells. We show that  $\beta$ -mRNA is specifically targeted and translationally silenced by miR-127-5p. We report that miR-127-5p is highly expressed in human fetal liver and show that  $\beta$ -F1-ATPase expression is post-transcriptionally regulated during human liver development. We suggest that miR-127-5p might play a relevant role in controlling the bioenergetic phenotype of the hepatocyte during human development. Moreover, we have estimated that the content of  $\beta$ -F1-ATPase at the plasma membrane of human and rat hepatocytes and HepG2 cells is insignificant as assessed by conventional immunological techniques with validated antibodies.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plasmids and cloning strategies

The plasmids expressing a hybrid GFP fused in frame with the mitochondrial targeting sequence of  $\beta$ -F1-ATPase ( $p\beta$ ) [27] containing either the 3'UTR of human  $\beta$ -mRNA ( $p\beta$ GFP-3' $\beta$ h, pIW22) or  $\alpha$ -F1-ATPase mRNA ( $\alpha$ -mRNA) ( $p\beta$ GFP-3' $\alpha$ h, pIW23) were cloned as described [9]. The plasmid  $p\beta$ -GFP-3' $\beta$ MUT (pIW29) contains four point mutations in the 3'UTR seed sequence of the hsa-miR-127-5p binding site of  $\beta$ -mRNA. To introduce the mutations, two overlapping PCR products containing the desired mutations were amplified using oligos F-pre $\beta$ -EGFP-KpnI: 5'-GCGGGTACCCGAATCCAGTCTC-3'/R-3' $\beta$ hBmut-PCR1a: 5'-CACAGAAAATAAGGGTCTTTGGGTTAGG-3' and F-3' $\beta$ -h-EcoRI: 5'-GCGGAATTCGGGGTCTTTGTCTCTGTA-3' / F-3' $\beta$ hBmut-PCR1b: 5'-CCTAACCCAAAGACCTTATTTTCTGTG-3'. The PCR products were mixed 1:1, incubated for 5 min at 94 °C and 30 min at 37 °C to allow annealing of complementary tails. To form one full length mutated PCR fragment, 1.75 mM dNTPs and 1 U/ $\mu$ l of Klenow DNA polymerase were added and incubated for 30 min at 37 °C. The product from this reaction was used as a template for a second PCR reaction using the outer primers F-3' $\beta$ -h-EcoRI: 5'-GCGGAATTCGGGGTCTTTGTCTCTGTA-3' and R-3' $\beta$ -h-XhoI: 5'-GCGCTCGAGTTTTTTTTTTTGGAGGGGTGTA-3'. The amplified PCR fragment was purified, digested with EcoRI and XhoI and cloned into the  $p\beta$ GFP-3' $\Delta$  plasmid [9].

### 2.2. Cell cultures, generation of GFP expressing cells and transfection of plasmids and miRNAs

The human BT549 breast and HepG2 liver cancer cell lines were grown in RPMI and DMEM respectively, supplemented with 10% FBS, 400  $\mu$ M non-essential amino acids, 1 mM glutamine, 100 UI/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin. Cells were transfected with plasmids  $p\beta$ GFP-3' $\alpha$ h or  $p\beta$ GFP-3' $\beta$ h using Lipofectamine and Plus reagent (Invitrogen). After 24 h of transfection cells were split 1:10 and 1:20 into 10 cm plates and grown in the appropriate medium containing 0.3 mg/ml geneticin (G418, GIBCO). After 1–2 weeks isolated colonies began to appear and the drug-resistant GFP-fluorescent clones were isolated with cloning cylinders and sub-cloned into 96-well plates. The clones were expanded and the purity of the cell population analyzed by flow cytometry. miRNAs were transfected at the time of plating using siPORT NeoFx reagent (Ambion/Applied Biosystems). The medium was changed at 24 h post-transfection and the cells were analyzed at 48 h post-transfection. miRNAs were used at a final concentration 30 nM. The pre- and anti-miRNAs used in this study were purchased

from Ambion/Applied Biosystems and were PM11164 (pre-miRNA hsa-miR-423-5p), PM11414 (pre miRNA hsa-miR-101), PM13001 (pre-miRNA hsa-miR-127-5p), PM11646 (pre-miRNA hsa-miR-581), PM10492 (pre-miRNA hsa-miR-200b), PM11753 (pre-miRNA hsa-miR-186), PM10632 (pre-miRNA hsa-miR-103), AM11164 (anti-miRNA hsa-miR-423-5p), AM11646 (anti-miRNA hsa-miR-581), AM10492 (anti-miRNA hsa-miR-200b), AM11753 (anti-miRNA hsa-miR-186), AM10632 (anti-miRNA hsa-miR-103), AM13001 (anti-miRNA hsa-miR-127-5p) and AM17110 (miRNA negative control #1). Co-transfection of miR-127-5p and the plasmids  $p\beta$ -GFP-3' $\beta$ MUT or  $p\beta$ -GFP-3' $\beta$  were performed in a 1:1 molar ratio using Lipofectamine and Plus reagent (Invitrogen). In all cases the cell culture was incubated with the cationic-lipid-DNA complexes for 2 h at 37 °C.

### 2.3. Flow cytometry

After 48 h of transfection cellular pellets were resuspended in 200–400  $\mu$ l FACS solution (1% FBS, 0.1% NaN<sub>3</sub> and 1  $\times$  PBS) and analyzed by flow cytometry. The fluorescence intensity of at least 10,000 events was determined in a FACScan cytometer (Becton–Dickinson) using CellQuest (Becton–Dickinson) acquisition software. The results were analyzed with the program FlowJo (TreeStar).

### 2.4. Screening of potential miRNAs by fluorescence reporter assays

Over-expression and silencing assays of the selected miRNAs were performed in BT549 clones stably expressing a mitochondrial localized GFP fused to the 3'UTR of  $\beta$ -F1-ATPase mRNA (BT549: $p\beta$ GFP-3' $\beta$ ) using the indicated miRNAs precursors (pre-miRNA), anti-miRNAs and miRNA negative control #1. As an additional control of the screening experiments BT549 clones stably expressing a mitochondrial localized GFP fused to the 3'UTR of  $\alpha$ -F1-ATPase mRNA (BT549: $p\beta$ GFP-3' $\alpha$ ) were studied in parallel. The assays were carried out in 96-well plates with a black border and a clear flat bottom (Corning). After 48 h of transfection the cells were stained for 10 min at 37 °C with 5  $\mu$ g/ml of Hoescht (Sigma) diluted in cell culture medium without phenol red. The fluorescence intensity of Hoescht (excitation: 340–10 nm, emission: 470–10 nm) and of GFP (excitation: 485 nm, emission: 510–10 nm) was determined using a FLUOstar Omega Microplate Reader (BMG Labtech). The fluorescence intensity of GFP was normalized by the number of cells as determined by Hoechst fluorescence intensity and quantified relative to the cells transfected with a non-relevant miRNA (control).

### 2.5. Cloning, expression and purification of $\gamma$ -F1-ATPase and antibody production

The cDNA (BC000931) encoding human  $\gamma$ -F1-ATPase (AAH35198) was amplified by PCR using the LGC-Promochem MGC-5380 clone and primers 5'-cgcgagctcatgtctctcgcgcg-3' and 5'-atagtttagcggccgcatccagagctgctgc-3' which add SacI and NotI restriction sites, respectively. The resulting product was purified and first cloned into pGEM-Teasy vector (Promega) and after into pQE-Trisystem [28]. The resulting plasmid, pQE- $\gamma$ F1, that encodes  $\gamma$ -F1-ATPase with C-terminal 6 $\times$ His and streptavidin tags, was used to transform *Escherichia coli* BL-21 cells. Protein expression was induced by addition of 1 mM IPTG. After overnight induction, the cells were collected and the expressed protein purified using Ni-NTA superflow resin (Qiagen) [28]. To produce monoclonal antibodies against human  $\gamma$ -F1-ATPase, we proceeded as recently described [28]. In brief, BALB/c mice were immunized with various doses of the purified protein (20  $\mu$ g) and the hybridomas produced by fusing spleen cells with the SP2 myelomas. Supernatants of the hybridomas were screened by indirect ELISA on  $\gamma$ -F1-ATPase-coated polystyrene plates. Bound antibodies were detected using horseradish-peroxidase-labeled goat anti-mouse antibodies (1:1000 DAKO). The positive colonies were

cloned by limiting dilution. Mouse monoclonal antibodies were purified with Montage antibody purification kit (Millipore) and used at a 1:1000 dilution.

## 2.6. Quantification of miRNA and mRNA

RNA was extracted from cell cultures using TRIzol Reagent (Invitrogen). Human fetal (20–44 weeks, #636540 from Clontech and A601605 and A604419 from BioChain) and adult (51–64 year-old men, #636531 from Clontech and B510061 and B510092 from BioChain) total liver RNA were purchased. The expression level of mature miRNAs was determined using TaqMan MicroRNA Assay from Applied Biosystems, which includes a unique set of RT-PCR primers and a specific TaqMan probe. RNA was reverse transcribed using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). The TaqMan MicroRNA Assays used in this study were RNU48 (#001006, Applied Biosystems), U6 snRNA (#001973, Applied Biosystems) and hsa-miR-127-5p (#002229, Applied Biosystems). The qPCR reaction was performed as indicated by the supplier using 2X Universal Master Mix without UNG (Applied Biosystems) and an ABI PRISM 7900 SDS thermocycler. Expression of miR-127-5p was determined according to the  $\Delta\Delta C_t$  method using RNU48 (cell lines) or U6 (human samples) as internal controls, respectively. Quantification of  $\beta$ -mRNA,  $\gamma$ -F1-ATPase and succinate dehydrogenase subunit B (SDH-B) mRNAs and 18S rRNA expression in human liver samples by RT-PCR was performed as described [9,11].

## 2.7. Protein extraction and Western blotting

For protein extraction, cellular pellets were resuspended in lysis buffer (25 mM Hepes, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF and 5  $\mu$ g/ml leupeptin) supplemented with complete protease inhibitor cocktail EDTA-free (Roche). Cell lysates were clarified by centrifugation at 10,000 $\times$ g for 7 min. Adult human liver samples were obtained from the Banco de Tejidos y Tumores, IDIBAPS, Hospital Clinic, Barcelona, Spain, coded for anonymity [29]. The Institutional Review Board approved the project. Fetal human liver lysates were purchased from ProSci Incorporated (#XBL-10409), Abcam (ab29890) and BioChain (A605254). Protein concentrations were determined with the Bradford reagent (Bio-Rad Protein Assay). Protein extracts were fractionated on SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes for immunoblot analysis. The primary monoclonal antibodies used were: anti-Hsp60 (Stressgene SPA-807, 1:5000), anti-GFP (Clontech, 1:10,000), anti- $\beta$ -actin (Sigma, 1:100,000), anti- $\gamma$ -F1-ATPase (1:1000), anti-E-cadherin (BD Pharmingen, 1:1000) and anti-SDH-B (Molecular Probes, 1:500), anti- $\beta$ -F1-ATPase (Ab1) (Molecular Probes, 1:1000) and the polyclonal rabbit anti- $\beta$ -F1-ATPase (Ab2) (1:15,000) [29] and (Ab3) [30]. Peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgGs (Nordic Immunology, 1:5000) were used as secondary antibodies. The blots were developed using the ECL reagent (Invitrogen).

## 2.8. Immunohistochemistry

Paraffin-embedded human liver 5  $\mu$ m tissue sections were stained using a diaminobenzidine-based method using the Envision-Plus-horseradish peroxidase system (DAKO) as detailed [29]. The dilution of the anti- $\beta$ -F1-ATPase (Ab2) used was 1:3000. Nuclei were counterstained with hematoxylin.

## 2.9. Electron microscopy

Small pieces (~1 mm<sup>3</sup>) of rat liver samples were fixed by immersion in freshly prepared 4% paraformaldehyde in 0.1 M Sørensen phosphate buffer, pH 7.2 and supplemented with 6% sucrose, for 2 h at 4 °C. Samples were rinsed in buffer and the free-aldehyde groups

were quenched with 50 mM ammonium chloride in PBS for 60 min at 4 °C. Afterwards, the samples were rinsed in PBS, dehydrated in acetone and finally processed for embedding in Lowicryl K4M (Polysciences Europe, Eppelheim, Germany) according to manufacturer's instructions. Gold interferential color ultrathin sections were collected in collodion/carbon-coated nickel grids. For the immunocytochemical localization of  $\beta$ -F1-ATPase, the grids were incubated with a 1:50 dilution of anti- $\beta$ -F1-ATPase (Ab3) [30]. After three washes with PBS, grids were incubated for 45 min with Protein A-gold complex (10 nm). Fixation was carried out with 1% glutaraldehyde in PBS. Counterstaining was performed with 2% uranyl acetate (7 min) and 1% lead citrate (45 s). The grids were observed in a Jeol 1010 electron microscope under 80 kV accelerating voltage.

## 2.10. Immunofluorescence

For double-immunofluorescence microscopy HepG2 cells were grown on coverslips and fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 30 min. Cellular permeabilization was achieved by incubation with 0.1% Triton X-100 for 10 min. Coverslips were first incubated in 1% FCS in PBS for 10 min and washed before incubation with the primary monoclonal anti- $\beta$ -catenin (BD Pharmingen, 1:100) and the polyclonal anti- $\beta$ -F1-ATPase (Ab2) antibodies. After, coverslips were incubated for 1 h in the dark with goat-anti rabbit IgGs conjugated to Alexa 594 and goat anti-mouse IgGs conjugated to Alexa 488. Cellular staining was analyzed in a confocal microscope Biorad Radianc 2000 Zeiss Axiovert S100TV.

## 2.11. Purification of mitochondria and plasma membranes

Rat liver homogenates were prepared in a solution containing 0.25 M sucrose, 1 mM EGTA and 10 mM Tris-HCl pH 7.4 and centrifuged at 800 g for 10 min to remove nuclei and unbroken cells. The resulting post-nuclear supernatants (H) were fractionated on 35 ml sucrose density gradients [24–54% (w/v)]. The gradients were centrifuged at 145,000 g for 70 min at 4 °C. Fractions were collected from the bottom of the tube and the localization of mitochondria (Mi) performed by western blotting using antibodies against  $\beta$ -F1-ATPase and Hsp60. Liver post-nuclear supernatants (H) were centrifuged first at 8500 g for 10 min and the resulting supernatants were further centrifuged at 180,000 g for 1 h. The resulting microsomal pellet was homogenized in 20 ml of 57% sucrose and placed on the bottom of the centrifuge tube. Thirty ml of 34% sucrose was added on top of the microsomal sample. The discontinuous gradient was centrifuged at 54,000 g for 16 h at 4 °C. Fractions were collected from the bottom of the tube and the localization of the plasma membrane (PM) fraction performed by western blotting using antibodies against E-cadherin (BD Pharmingen, 1:1000).

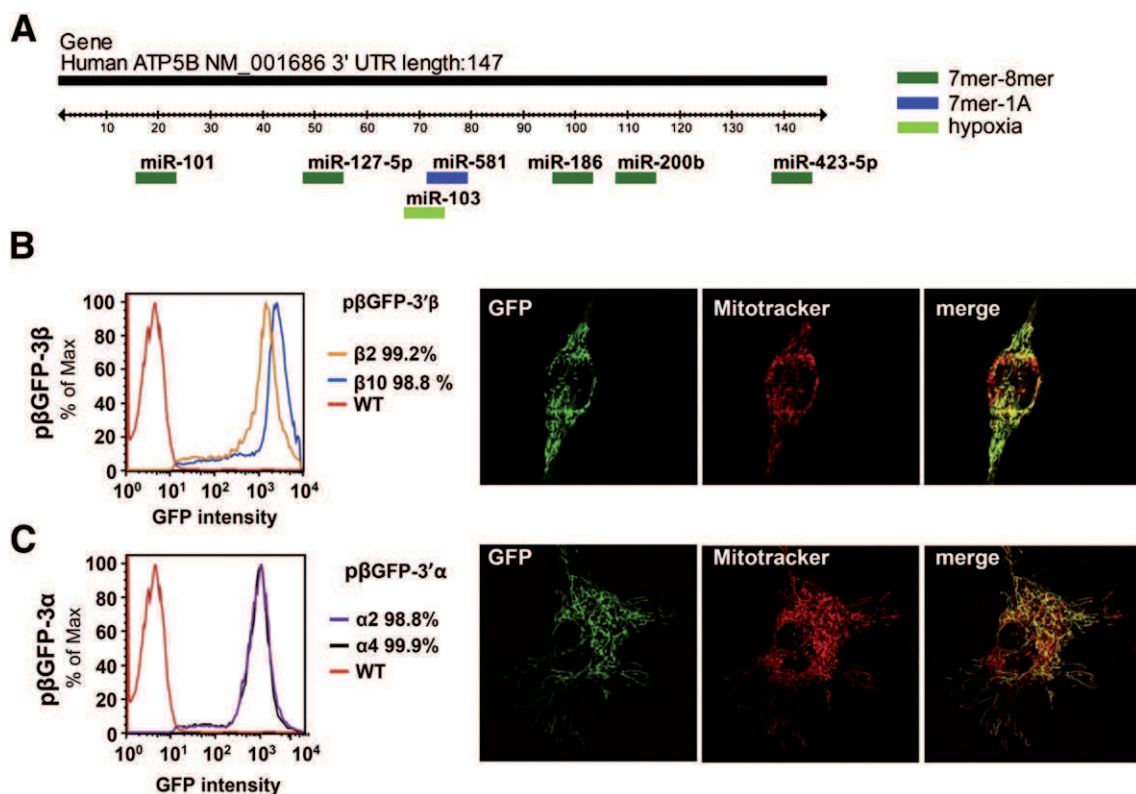
## 2.12. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using a two-tailed Student's *t*-test. The results shown are means  $\pm$  SEM. A *p* < 0.05 was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Potential miRNAs targeting the 3'UTR of human $\beta$ -mRNA

In order to identify potential miRNAs that could bind the 3'UTR of human  $\beta$ -mRNA we performed a bioinformatic study using the miRNA target prediction software TargetScan5.1 (<http://www.targetscan.org/>). The TargetScan prediction algorithm is based on few binding rules [31–33]. In brief, the most important requirement seems to be a contiguous and perfect Watson-Crick base pairing of the 5'-miRNAs "seed" region. Matching of the mRNA to the miRNA seed can be divided into 8mer-, 7mer- and 6mer-sites. An A residue



**Fig. 1.** Tools for the identification of miRNAs targeting the 3'UTR of human  $\beta$ -mRNA. (A) Schematic illustration of the 3'UTR of human  $\beta$ -mRNA and of the miRNAs predicted to bind the 3'UTR with higher affinity (TargetScan). Binding sites and types of the miRNAs selected are indicated in color code. The hypoxia regulated miR-103 (light green) was also included in the study for the putative relevance that hypoxia might play in regulating  $\beta$ -F1-ATPase expression. Generation and analysis of the BT549:p $\beta$ GFP-3 $\beta$  (B) and BT549:p $\beta$ GFP-3 $\alpha$  (C) cell lines used to screen the activity of miRNAs. Graphs in B and C illustrate the GFP fluorescence of BT549 clones that express mitochondria-targeted GFP fused to the 3'UTR of human  $\beta$ -mRNA (clone  $\beta$ 2, orange and  $\beta$ 10, blue) or to the 3'UTR of  $\alpha$ -mRNA (clone  $\alpha$ 2, magenta and  $\alpha$ 4, blue), respectively. The percentage of GFP expressing cells is indicated. The basal cellular fluorescence of the parental wild type (WT) BT549 cells is shown in red trace. Representative immunofluorescence examples of the targeting of GFP (green) to MitotrackerRed stained mitochondria (red) in BT549:p $\beta$ GFP-3 $\beta$  (B) and BT549:p $\beta$ GFP-3 $\alpha$  (C) cells.

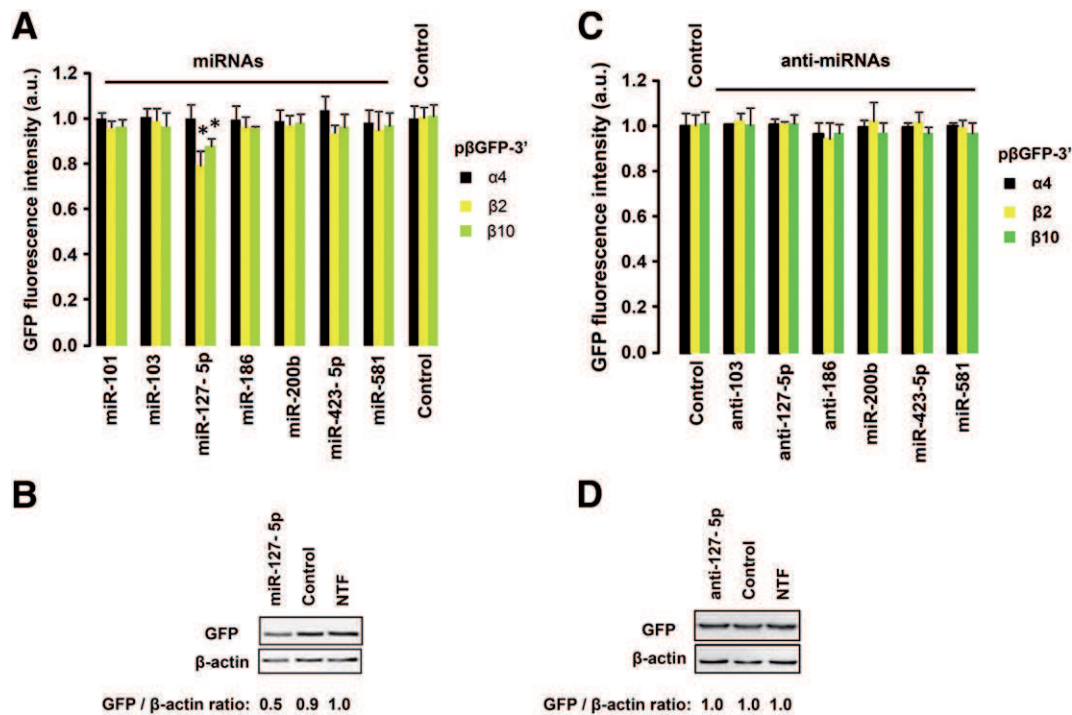
at position 1 (7mer-A1) and an A or U at position 9 of the miRNA improves miRNA activity [33]. In addition, miRNAs that are conserved among different species are preferentially selected. Following these binding rules and with the purpose of covering the entire length of the 3'UTR of  $\beta$ -mRNA we selected miR-101, miR-127-5p, miR-186, miR-200b, miR-423-5p and miR-581 as the strongest candidates from the *in silico* results (Fig. 1A). miR-103 was also included in the study because of the putative relevance that hypoxia [34] might have in regulating  $\beta$ -F1-ATPase expression, even though miR-103 does not fit to the above mentioned rules.

### 3.2. miR-127-5p is a potential regulator of $\beta$ -F1-ATPase expression

For screening purposes, and in order to analyze the influence of miRNAs on the expression of  $\beta$ -F1-ATPase in breast cancer cells, we generated BT549 cell lines that stably express a mitochondrial targeted GFP reporter bearing the 3'UTR of  $\beta$ -mRNA (Fig. 1B). The pre-sequence of  $\beta$ -F1-ATPase (p $\beta$ ) was fused in frame upstream of the GFP coding region to localize the reporter protein into mitochondria [27] because this *cis*-acting element of  $\beta$ -mRNA is also required for the appropriate subcellular localization of the mRNA [6]. To assess the specificity of the action of the selected miRNAs on the 3'UTR of  $\beta$ -mRNA we also developed BT549 cell lines stably expressing the same reporter but containing the 3'UTR of  $\alpha$ -F1-ATPase mRNA ( $\alpha$ -mRNA) (Fig. 1C) which is a counterpart subunit of  $\beta$ -F1-ATPase in the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase [1]. After generation of the stable cell lines both the p $\beta$ GFP-3 $\alpha$  and p $\beta$ GFP-3 $\beta$  expressing cells were analyzed by flow cytometry to analyze the purity of the clones as

well as their GFP fluorescence intensity. The analysis showed that the selected p $\beta$ GFP-3 $\beta$  ( $\beta$ 2 and  $\beta$ 10 in Fig. 1B) and p $\beta$ GFP-3 $\alpha$  ( $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 4 in Fig. 1C) clones exhibited a well-defined and single peak of high-intensity GFP fluorescence ( $> 10^3$  a.u.), indicating a very high degree of purity ( $> 98\%$ ). The red traces in Fig. 1B and C show the background of the fluorescence signal of wild type cells ( $10^0$ – $10^1$  a.u.). Therefore, shifts in the fluorescence intensity of the generated clones can be taken as indicative of interfering GFP expression by the effect of the transfected miRNA precursor molecules (pre-miRNAs), which are designed to directly enter the miRNA processing pathway and mimic endogenous miRNAs in the cells. Moreover, all the clones targeted GFP to mitochondria as revealed by the co-localization of GFP fluorescence with Mitotracker Red by confocal microscopy (Fig. 1B and C).

In order to identify which of the selected miRNAs might be relevant in controlling  $\beta$ -F1-ATPase expression we first carried out miRNA over-expression experiments using miRNA precursors (pre-miRNA) in the GFP-tagged cells. The relative activity of the miRNAs targeting the 3'UTR of  $\beta$ -mRNA was assessed by determining the relative GFP fluorescence intensity of p $\beta$ GFP-3 $\beta$  clones when compared to that of p $\beta$ GFP-3 $\alpha$  clones (Fig. 2A). The study revealed that from all the miRNAs analyzed only miR-127-5p triggered a significant decrease in GFP fluorescence in both p $\beta$ GFP-3 $\beta$  clones ( $\beta$ 2 and  $\beta$ 10 in Fig. 2A) when compared to p $\beta$ GFP-3 $\alpha$  clones ( $\alpha$ 4 in Fig. 2A) and cells transfected with a non-relevant miRNA (control in Fig. 2A). Western blot analysis of p $\beta$ GFP-3 $\beta$ 2 cells confirmed a reduced expression of the GFP reporter when cells were treated with miR-127-5p (Fig. 2B). Notably, silencing experiments using the corresponding anti-miRNAs, including anti-



**Fig. 2. Fluorescence reporter assays identify miR-127-5p as a potential regulator of  $\beta$ -F1-ATPase expression.** **A**, The GFP fluorescence intensity of two BT549 cell clones ( $\beta$ 2 in yellow and  $\beta$ 10 in green) expressing p $\beta$ GFP-3' $\beta$  was determined after 48 h of transfection with the indicated miRNAs precursors using a fluorescence luminometer. Data were normalized relative to the number of cells as determined by Hoechst fluorescence intensity and quantified relative to the mean GFP fluorescence of control cells transfected with a non-relevant miRNA (control). The fluorescence intensity of BT549 cells expressing p $\beta$ GFP-3' $\alpha$  ( $\alpha$ 4 in black) was also analyzed as an additional control of the screening. The results shown are the means  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*,  $p < 0.0001$  when compared to p $\beta$ GFP-3' $\alpha$  by Student's t-test. **B**, Western blot analysis of GFP expression in total cell lysates of BT549:p $\beta$ GFP-3' $\beta$ 2 cells non-transfected (NTF) or transfected with pre-miR-127-5p (miR-127-5p) or a scramble miRNA (control). The GFP/ $\beta$ -actin ratio is indicated. **C**, Fluorescence reporter assays using anti-miRNAs. The GFP fluorescence intensity of two BT549 cell clones ( $\beta$ 2 in yellow and  $\beta$ 10 in green) expressing p $\beta$ GFP-3' $\beta$  was determined after 48 h of transfection. Data were normalized as indicated in **A**. The fluorescence intensity of BT549 cells expressing p $\beta$ GFP-3' $\alpha$  ( $\alpha$ 4 in black) was also analyzed as an additional control of the screening. The results shown are the means  $\pm$  SEM of three independent experiments. **D**, Western blot analysis of GFP expression in total cell lysates of BT549:p $\beta$ GFP-3' $\beta$ 2 cells non-transfected (NTF) or transfected with anti-miR-127-5p or a scramble miRNA (control). The GFP/ $\beta$ -actin ratio is indicated.

miR-127-5p, revealed that none of them had a relevant effect on the fluorescence intensity (Fig. 2C) and GFP expression (Fig. 2D) of p $\beta$ GFP-3' $\beta$  clones when compared to controls.

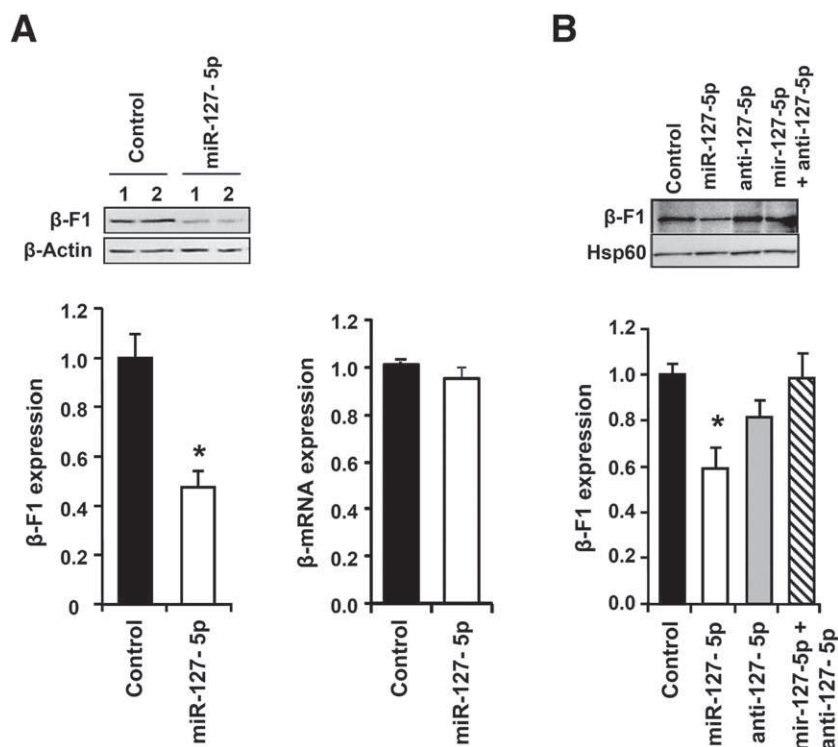
### 3.3. $\beta$ -mRNA is targeted and silenced by miR-127-5p

Next, we questioned about the activity of miR-127-5p on the expression of the endogenous  $\beta$ -F1-ATPase. Transfection of miR-127-5p precursors in parental BT549 cells provoked a significant decrease in the expression of  $\beta$ -F1-ATPase protein (Fig. 3A, histogram to the left). In this situation, the cellular content of  $\beta$ -mRNA was not affected when compared to control cells that were transfected with a non relevant miRNA (Fig. 3A, histogram to the right). Consistent with the above mentioned findings (Fig. 2C and D) the transfection of BT549 cells with anti-miR-127-5p had no effect on  $\beta$ -F1-ATPase expression (Fig. 3B), suggesting that BT549 breast cancer cells do not express significant levels of miR-127-5p. The determination of miR127-5p expression in BT549 and other cancer cell lines confirmed the lack of expression of this miRNA in these cells (see Fig. 5A), raising the question of what is the physiological context where miR127-5p might be of relevance in controlling the expression of human  $\beta$ -F1-ATPase. Anyway, the negative effect of miR-127-5p on  $\beta$ -F1-ATPase expression was further underlined by the observation that the expression of  $\beta$ -F1-ATPase was restored to that of control cells when miR-127-5p expression was silenced by co-transfection with anti-miR-127-5p (Fig. 3B).

To verify that the down-regulation of  $\beta$ -F1-ATPase expression is due to the targeting of miR-127-5p to its presumed binding site on the 3'UTR of  $\beta$ -mRNA we generated a mutated version of the

p $\beta$ GFP-3' $\beta$  expression plasmid (p $\beta$ GFP-3' $\beta$ MUT) that contains four point mutations on the miR-127-5p binding region (Fig. 4A). Preliminary experiments indicated that the fluorescence intensity of p $\beta$ GFP-3' $\beta$ MUT expressing cells was not significantly affected by the co-expression of miR-127-5p (1.00 versus 0.96 arbitrary units in the absence or presence of miR-127-5p, respectively). Analysis of GFP fluorescence in BT549 cells co-transfected with the miR-127-5p precursor and p $\beta$ GFP-3' $\beta$  or p $\beta$ GFP-3' $\beta$ MUT plasmids revealed that whereas miR-127-5p significantly inhibited GFP fluorescence derived from the p $\beta$ GFP-3' $\beta$  plasmid the expression of GFP derived from the mutated plasmid was not affected (Fig. 4A). These findings were further confirmed by western blot analysis (Fig. 4B), that illustrated a very sharp reduction of GFP expression derived from the p $\beta$ GFP-3' $\beta$  plasmid whereas GFP expression was not affected from the p $\beta$ GFP-3' $\beta$ MUT expressing cells. It should be noted that over-expression of miR-127-5p promoted in both p $\beta$ GFP-3' $\beta$  and p $\beta$ GFP-3' $\beta$ MUT expressing cells a significant reduction of the endogenous  $\beta$ -F1-ATPase (Fig. 4B). Taken together, these results illustrate that miR-127-5p targets the 3'UTR of human  $\beta$ -mRNA and interferes with translation of the transcript.

It appears that western blots are more sensitive than fluorescence analysis to illustrate the activity of a particular miRNA (compare differences in GFP expression between Fig. 4B and A). Since this situation raised the possibility that other of the miRNAs studied in this work (Fig. 2A) could have some effect on  $\beta$ -F1-ATPase expression, presumably with less activity than miR-127-5p, we also verified the activity of the miRNAs by western blotting (Fig. 4C). The results obtained confirmed the data of the fluorescence study (Fig. 2A), i.e., only miR-127-5p has relevant activity as regulator of the expression of  $\beta$ -F1-ATPase (Fig. 4C).



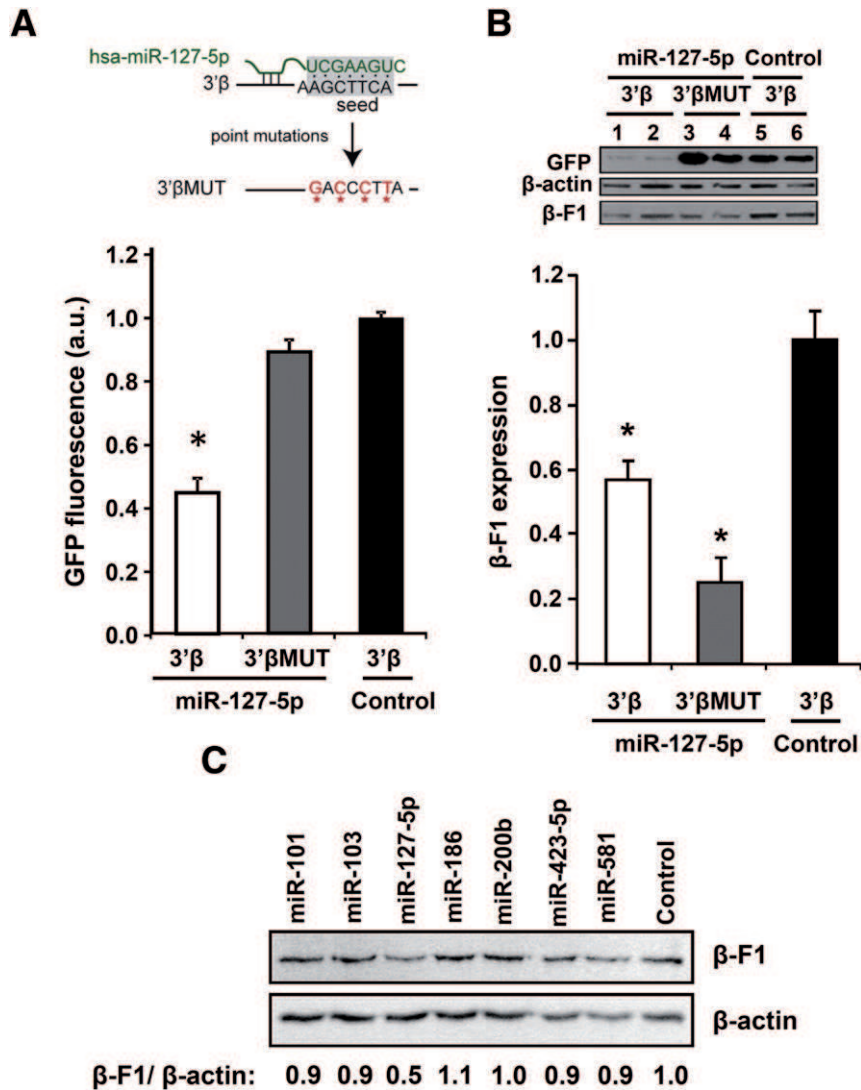
**Fig. 3. miR-127-5p inhibits the translation of  $\beta$ -mRNA.** **A**, Western blot analysis of the expression of  $\beta$ -F1-ATPase in total cell lysates (histogram to the right) and RT-qPCR quantification of  $\beta$ -mRNA (histogram to the left) of BT549 cells transfected with miR-127-5p precursor (miR-127-5p, open bars) or a scramble miRNA (control, closed bars). Lanes 1 and 2 correspond to two different experiments of the same experimental condition. The results shown are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. The quantification of  $\beta$ -F1-ATPase expression is indicated using  $\beta$ -actin as reference protein. \*,  $p < 0.001$  when compared to control by Student's t-test. **B**, Analysis of  $\beta$ -F1-ATPase expression in BT549 cells transfected with miR-127-5p precursor (open bar), anti-miR-127-5p (gray bar), both miR-127-5p precursor + anti-miR-127-5p (hatched bar) or a negative control miRNA (control, closed bar). The quantification of  $\beta$ -F1-ATPase expression is indicated using Hsp60 as reference protein. The results shown are the means  $\pm$  SEM of four independent experiments. \*,  $p < 0.05$  when compared to control by Student's t-test.

#### 3.4. miR-127-5p is expressed in human liver but not in cancer cells

To identify in which physiological context miR-127-5p could affect  $\beta$ -F1-ATPase expression we first analyzed by RT-qPCR its expression in several human cancer cell lines. The results obtained revealed that breast (BT549 and T47D), colon (HCT116), lung (Hop62), HeLa and Jurkat cancer cells do not express significant levels of miR-127-5p (Fig. 5A), most likely indicating that miR-127-5p does not play a role in silencing  $\beta$ -mRNA translation in these carcinomas. In contrast, human fetal liver samples expressed highly significant levels of miR-127-5p when compared to adult livers (Fig. 5A), suggesting that it might play a role in controlling  $\beta$ -F1-ATPase expression in the human liver during development. Interestingly, the expression of proteins involved in energy metabolism, such as subunits  $\beta$ -F1-ATPase and  $\gamma$ -F1-ATPase of the mitochondrial  $H^+$ -ATP synthase and of subunit B of succinate dehydrogenase (SDH-B) is barely detectable in fetal liver extracts but show a remarkable increase in their expression in the adult liver (Fig. 5B). In contrast, it should be noted that the expression of the structural mitochondrial protein Hsp60 did not show significant differences between fetal and adult liver extracts (Fig. 5B). Therefore, the  $\beta$ -F1-ATPase/Hsp60 ratio increased significantly during development of the human liver (Fig. 5B), in agreement with previous results in rat liver that illustrated the rapid postnatal biogenesis and functional differentiation of mammalian mitochondria [7,35–37]. Consistent with the relevance of translational control for the biosynthesis of  $\beta$ -F1-ATPase observed in lower mammals [36], we noted that liver mRNA levels for both the  $\beta$  and  $\gamma$  subunits of the  $H^+$ -ATP synthase as well as of SDH-B showed no relevant changes during development (Fig. 5C), i.e., the mRNAs are represented at the time of development when the amount of the proteins is very limited. This was not the situation for the liver content of Hsp60 where both mRNA (Fig. 5C) and protein (Fig. 5B) levels correlated.

#### 3.5. $\beta$ -F1-ATPase is not expressed at the plasma membrane of the hepatocytes

It has been reported that  $\beta$ -F1-ATPase is a high-density lipoprotein (HDL) receptor for apolipoprotein A-I localized on the plasma membrane of rat and human hepatocytes and HepG2 cells [38]. To find out the fraction that plasma membrane  $\beta$ -F1-ATPase might represent from the total cellular content of the protein we have studied the expression and localization of  $\beta$ -F1-ATPase in rat and human liver as well as in HepG2 cells using different experimental techniques and antibodies (Ab1, Ab2 and Ab3) (Fig. 6). Immunohistochemistry of paraffin-embedded human liver sections using a polyclonal antibody against  $\beta$ -F1-ATPase (Ab2) [29] revealed no immunoreactive material on the plasma membrane of the hepatocytes whereas a strong labeling of cytoplasmic organelles was observed (Fig. 6A). High-resolution immunoelectron microscopy of rat liver thin sections, using a different antibody (Ab3) [30], showed a strong gold decoration of mitochondria of the hepatocytes in the absence of plasma membrane recognition of any immunoreactive material (arrows in Fig. 6B). Double-immunofluorescence microscopy of non-permeabilized HepG2 cells using an antibody against  $\beta$ -catenin, a plasma membrane protein (green, Fig. 6C) and anti- $\beta$ -F1-ATPase (Ab2) (red, Fig. 6C) showed the almost complete absence of  $\beta$ -F1-ATPase on the plasma membrane. The only red signals appeared decorating the mitochondria of the few cells (<10%) that are inevitably permeabilized as a result of the fixation procedure (arrow in Fig. 6C). Similar findings were obtained using a commercially available antibody against  $\beta$ -F1-ATPase (Ab1) (data not shown). As expected, both Ab2 (Fig. 6D) and Ab1 (data not shown) specifically recognized mitochondria in permeabilized HepG2 cells. Altogether, we show that various cellular fixation procedures and localization techniques using different antibodies against  $\beta$ -F1-ATPase only



**Fig. 4.** miR-127-5p specifically targets the 3'UTR of human  $\beta$ -mRNA. **A**, Schematic illustration of the four point mutations (in red, asterisks) introduced in the 3'UTR of  $\beta$ -mRNA to generate the p $\beta$ -GFP-3 $\beta$ MUT plasmid (3 $\beta$ MUT). On top, the miR-127-5p (green) seed matching sequence on the 3'UTR of  $\beta$ -mRNA is indicated (highlighted in gray). The histogram shows the fluorescence intensity of BT549 cells co-transfected with miR-127-5p or a negative control miRNA (control) and reporter plasmids expressing GFP fused either to the 3'UTR of  $\beta$ -mRNA (3'β) (open and closed bars) or to the mutant 3'UTR of  $\beta$ -mRNA (gray bar, 3'βMUT). The results shown are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*,  $p < 0.001$  when compared to control by Student's *t*-test. **B**, Western blot analysis in total cell lysates of BT549 cells co-transfected with miR-127-5p precursor (lanes 1–4) or a negative control miRNA (control, closed bar) (lanes 5 and 6) and the reporter plasmids expressing GFP fused to the wild type 3'β (open bar) (lanes 1 and 2) and control (lanes 5 and 6) or mutant (3'βMUT, gray bar) (lanes 3 and 4) 3'UTR of  $\beta$ -mRNA. Two different experiments assayed in the same gel for each condition are shown. The lower histogram shows  $\beta$ -F1-ATPase ( $\beta$ -F1) expression relative to that of  $\beta$ -actin. The results shown are the mean  $\pm$  SEM of four experiments. \*,  $p < 0.005$  when compared to control by Student's *t*-test. Note the lack of effect of miR-127-5p on GFP expression derived from the 3'βMUT and the silencing of the endogenous  $\beta$ -F1-ATPase. **C**, Western blot analysis of  $\beta$ -F1-ATPase ( $\beta$ -F1) expression in BT549 cells transfected with the indicated miRNAs precursors or a scramble miRNA (control). The  $\beta$ -F1/ $\beta$ -actin ratio is indicated.

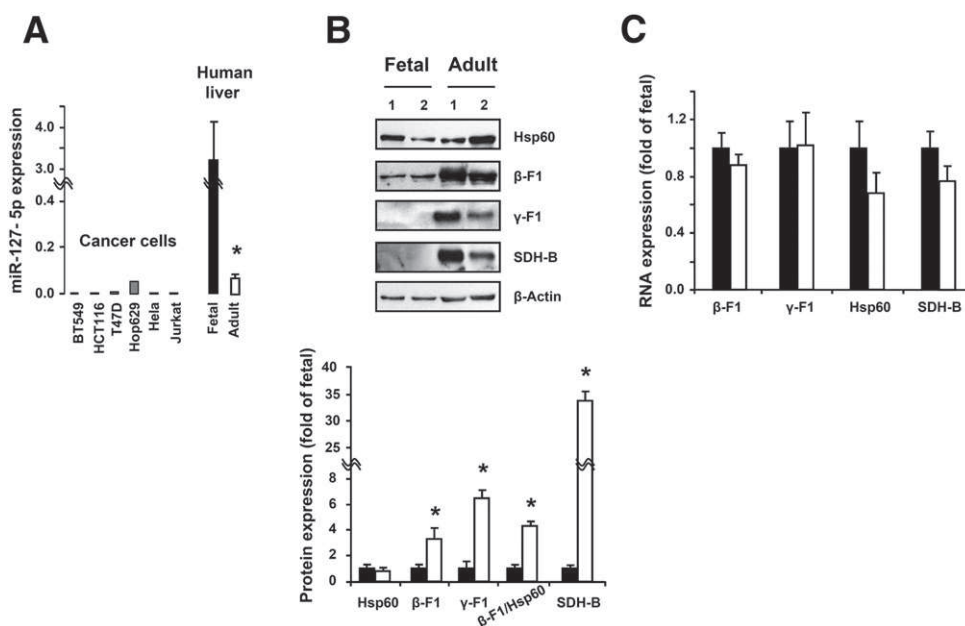
recognized immunoreactive material in mitochondria supporting the marginal presence of  $\beta$ -F1-ATPase at the plasma membrane of mammalian liver cells.

Furthermore, rat liver homogenates were prepared and the mitochondria and plasma membrane fractions purified (Fig. 6E). Western blotting of proteins from these fractions using specific antibodies against mitochondria (Hsp60 and  $\beta$ -F1-ATPase) and plasma membrane (E-cadherin) markers, confirmed the enrichment of mitochondria (compare H versus Mi in Fig. 6E) and plasma membranes (compare H versus PM in Fig. 6E) in their respective fractions. Remarkably, none of the three antibodies used against  $\beta$ -F1-ATPase recognized a band in the plasma membrane fractions (Fig. 6E). Similar negative findings have been obtained using a monoclonal anti- $\beta$ -F1-ATPase (data not shown) developed recently [39]. These results also support that there is no ectopic expression of  $\beta$ -F1-ATPase on the

cell surface of liver cells or, alternatively, that the content of  $\beta$ -F1-ATPase in the plasma membrane is negligible when considered the total cell content of the protein. Therefore, and for the rest of this work, we will not take into consideration the contribution that the plasma membrane protein could have in this study.

#### 4. Discussion

The control of  $\beta$ -F1-ATPase expression is essential for normal cell function. In fact, down-regulation of its expression is linked to cancer progression [10,29,40] or to the onset of a small group of devastating rare diseases [26]. In the present study we have investigated the role that miRNAs could play in controlling  $\beta$ -F1-ATPase expression in humans and the likely physiological context where they might exert their function. This is part of an ongoing project aimed at the



**Fig. 5. miR-127-5p is expressed in fetal human liver.** **A**, Quantification of miR-127-5p expression by RT-qPCR in human cancer cell lines (BT549, T47D, HCT116, Hop62, Jurkat and HeLa) and in fetal and adult human liver. miR-127-5p expression in the cell lines and during liver development was normalized to RNU48 and U6 RNA, respectively. The results shown are the mean  $\pm$  SEM of three experiments. \*,  $p < 0.005$  when compared to fetal by Student's *t*-test. **B**, Western blot analysis of the expression of the mitochondrial proteins Hsp60,  $\beta$ -F1-ATPase ( $\beta$ -F1),  $\gamma$ -F1-ATPase ( $\gamma$ -F1) and subunit B of succinate dehydrogenase (SDH-B) in human fetal and adult liver extracts. The expression of  $\beta$ -actin was used as reference of protein loading. Lanes 1 and 2 under the same heading correspond to two different fetal or adult liver extracts. The histogram summarizes the relative expression level of each protein in adult liver extracts (open bars) relative to the level observed in fetal extracts (closed bars). The  $\beta$ -F1-ATPase/Hsp60 ratio is also shown. The results shown are the mean  $\pm$  SEM of three different extracts. \*,  $p < 0.01$  when compared to fetal by Student's *t*-test. **C**, RT-qPCR analysis of  $\beta$ -F1-ATPase mRNA,  $\gamma$ -F1-ATPase mRNA, SDH-B mRNA and Hsp60 mRNA in fetal (closed bars) and adult (open bars) human liver samples. Data were normalized relative to 18S rRNA and are shown as fold change relative to the values in fetal liver. The results shown are the mean  $\pm$  SEM of three different samples.

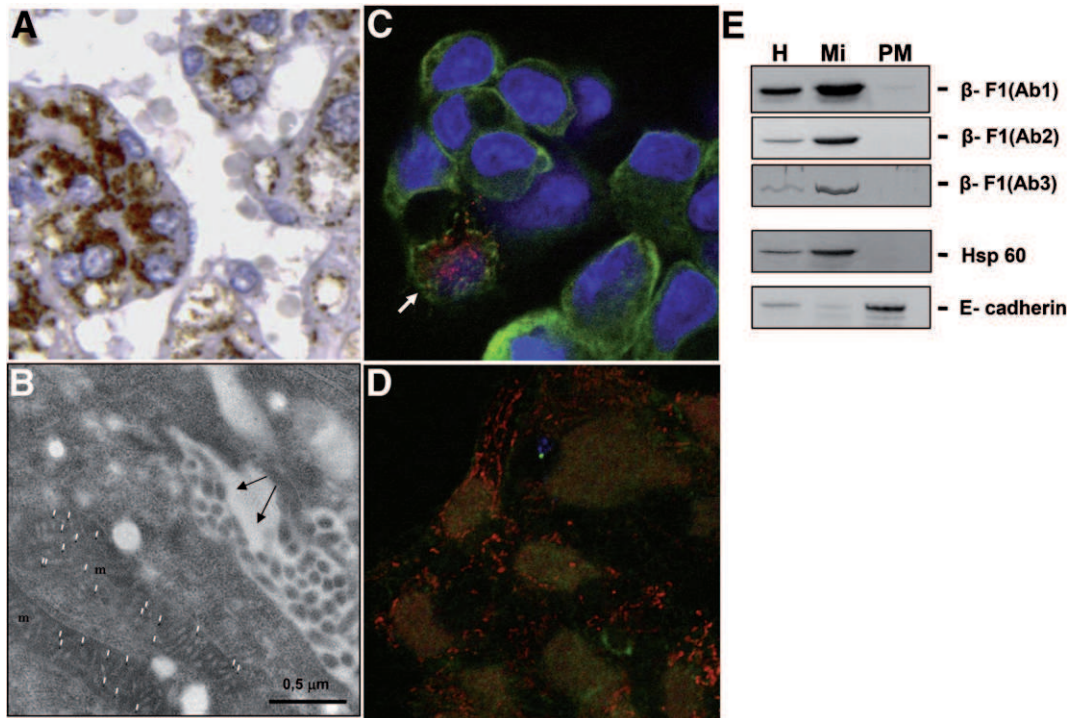
characterization of the post-transcriptional mechanisms involved in the regulation of  $\beta$ -F1-ATPase expression in human pathophysiology [4,10,11]. Initially, we intended to characterize the mechanism of repression of  $\beta$ -F1-ATPase expression in breast cancer [9]. Therefore, the BT549 breast cancer cell line was selected for developing the GFP-3' $\beta$  and GFP-3' $\alpha$  clones because it is a cell line that shows an intermediate expression level of  $\beta$ -F1-ATPase when compared to other breast cancer cells of the NCI panel (T47D, MDA-N > BT5490 = HS578T > MCF7, ADR-RES, MDA-231, MDA-435). Of the seven miRNAs studied we found that only miR-127-5p functionally interferes with  $\beta$ -F1-ATPase expression. Moreover, it was further found that this miRNA is not expressed in many cancer cells. This unexpected finding promoted the search for other physiological contexts where miR-127-5p might play a role in regulating the translation of  $\beta$ -mRNA and found its likely participation in development of the liver. A recent report identified miR-101 as a post-transcriptional regulator of  $\beta$ -F1-ATPase expression in HeLa cells [41]. Our fluorescence and western blot data in BT549 cells does not support such a role for miR-101 perhaps due to differences in the cells studied. In general, miRNAs silence gene expression by induction of mRNA degradation or by inhibition of its translation [22,42–44]. We illustrate that expression of miR-127-5p brings about a profound decrease in the steady state level of the endogenous  $\beta$ -F1-ATPase without affecting  $\beta$ -mRNA levels. Moreover, we show that miR-127-5p specifically targets the 3'UTR of the transcript. These results indicate that the mechanism of action of miR-127-5p on  $\beta$ -F1-ATPase expression is exerted by repressing  $\beta$ -mRNA translation.

In the mouse miR-127 is expressed in embryos, placenta and post-natal brain and muscle [45] as well as in fetal lung [46]. It is expressed as a part of a cluster with miR-136, miR-431, miR-432, and miR-433 both in normal tissues and cultured fibroblasts of mouse and humans [45,47]. The expression of the cluster and specifically of miR-127 is down-regulated in primary tumors and various cancer cell lines [47]. Moreover, the miR-127 promoter is embedded in a CpG island and

remains methylated in most tissues except sperm [47]. Treatment of cancer cells with chromatin-modifying drugs promoted the up-regulation of miR-127 which targets the mRNA of the protooncogene BCL6 to inhibit its expression [47]. Consistent with these findings, miR-127 is over-expressed in diffuse large B-cell lymphomas [48] and Epstein-Bar virus (EBV) positive Burkitt lymphomas [49], supporting that miR-127 acts as a potential tumor suppressor by blocking terminal differentiation of B-cells and hence favoring their proliferation [47–49]. A role for miR-127 has been suggested in the control of cellular differentiation because it is preferentially expressed in the mesenchymal rather than in the epithelial compartment of the lung towards the end of fetal stages of development [46]. In fact, over-expression of miR-127 in fetal lung cultures impedes normal lung differentiation [46]. Consistent with these findings we report that miR-127-5p is highly over-expressed in the fetal liver. Hence, we suggest that miR-127-5p does not play a role in controlling  $\beta$ -F1-ATPase expression in oncogenesis and thus in promoting the down-regulation of the protein that accompanies the bioenergetic switch during cellular transformation [10,40] but rather it represses the differentiation of mitochondria during fetal liver development [35].

Cancer cells and embryonic tissues display large phenotypic similarities regarding the molecular and functional activities of mitochondria [37,50]. In fact, fetal hepatocytes and hepatocarcinomas are highly glycolytic cells because both the number and the bioenergetic activity of their mitochondria are very low [35,37,50]. Consistent with the observations in lower mammals recent reports demonstrated that the activity of oxidative phosphorylation complexes increases significantly in liver, brain, muscle and heart of humans after birth [51,52]. The analogies also affect the mechanisms that control the expression of genes of the  $H^+$ -ATP synthase because  $\beta$ -mRNA is accumulated in a translation repressed state in fetal rat liver [2,7,36], in rat hepatocarcinomas [4] and in human lung, colon and breast carcinomas [9]. Accumulation of  $\beta$ -mRNA in developing liver and in rat





**Fig. 6. No evidence for the localization of  $\beta$ -F1-ATPase at the plasma membrane.** **A**, Immunohistochemical characterization of the expression of  $\beta$ -F1-ATPase in human liver sections using a polyclonal anti- $\beta$ -F1-ATPase (Ab2) only reveals the mitochondrial localization of the protein. **B**, High-resolution immunoelectron microscopy of rat liver ultrathin sections processed with a polyclonal anti- $\beta$ -F1-ATPase (Ab3) reveals the specific labeling (10 nm gold, white stripes) of mitochondria (m) in the absence of gold decoration of the plasma membrane (arrows) of the hepatocyte. **C**, Double immunofluorescence microscopy of non-permeabilized HepG2 cells with anti- $\beta$ -catenin (green) and anti- $\beta$ -F1-ATPase (Ab2) (red) reveals non-relevant immunolabeling of  $\beta$ -F1-ATPase on the plasma membrane. The only red signals observed ( $\beta$ -F1-ATPase) are confined to cytoplasmic organelles in few partially permeabilized cells as a result of the fixation procedure (arrow). **D**, Double immunofluorescence microscopy of permeabilized HepG2 cells reveals the almost complete absence of  $\beta$ -catenin signal (green). The strong red signals of the  $\beta$ -F1-ATPase antibody (Ab2) are confined to cytoplasmic organelles. **E**, Western blotting of rat liver postnuclear supernatants (H), purified mitochondria (Mi) and plasma membrane (PM) proteins using three different antibodies against the  $\beta$ -subunit of the  $H^+$ -ATP synthase (Ab1, Ab2 and Ab3). Probing of the membranes with anti-hsp 60 and anti-E-cadherin, markers of mitochondria and plasma membrane, respectively, confirmed the enrichment of mitochondria and plasma membranes in their respective fractions. The blots show no immunoreactivity against  $\beta$ -F1-ATPase at the PM fraction.

carcinomas is accounted for by controlling the rate of turnover of the transcript [4,36]. The storage of masked  $\beta$ -mRNA in the fetal liver and its rapid translational activation immediately after birth [2,7,36] is required to promote the functional differentiation of liver mitochondria [35] allowing adaptation of mammals to the aerobic environment. In agreement with these findings our study illustrates that subunits  $\beta$  and  $\gamma$  of the  $H^+$ -ATP synthase are hardly expressed in human fetal liver boosting their expression in the adult liver. Paradoxically, and consistent with findings in rat liver [36], we observed no differences in steady state  $\beta$ -mRNA levels in the human liver during development strongly suggesting that the low content of  $\beta$ -F1-ATPase in humans also results from translation silencing of the corresponding mRNA. Similar paradoxical findings were obtained for the counterpart  $\gamma$ -F1-ATPase subunit. The mechanisms that control the translation of  $\beta$ -mRNA are very complex [10] and, in addition to miR-127-5p,  $\beta$ -F1-ATPase expression is also regulated by specific RNA-binding proteins such as G3BP1 that also targets the 3'UTR of the transcript [11]. In this scenario, we suggest that protein- and RNA-mediated mechanisms that regulate the interaction of essential *cis*-acting elements of  $\beta$ -mRNA with the translational machinery are of upmost importance to unveil  $\beta$ -F1-ATPase expression in different physiological contexts [10]. Importantly, the  $\beta$ -F1-ATPase/Hsp60 ratio, which illustrates the energetic competence of mitochondria [29], showed a significant increase after birth. This finding indicates that human fetal liver mitochondria are deficient in the molecular components of the  $H^+$ -ATP synthase and perhaps in mitochondrial functionality, resembling very much the findings obtained in lower mammals [37,50]. Within this context, miR-127-5p might be of physiological relevance

to regulate the attenuation of  $\beta$ -mRNA translation during development of the human fetal liver.

Remarkably, the promoter of human miR-127 gene can be activated by estrogen related receptor gamma ( $ERR\gamma$ ) and alpha ( $ERR\alpha$ ) transcription factors [53]. Functional and biochemical studies have shown that  $ERR\alpha$  is involved in energy metabolism and mitochondrial biogenesis [54]. Together with PGC-1 $\alpha$ ,  $ERR\alpha$  is involved in the induction of the ATP5B gene that encodes  $\beta$ -F1-ATPase [55,56]. Thus, one can speculate that during fetal stages of human liver development  $ERR\alpha$  simultaneously activates the transcription of  $\beta$ -F1-ATPase and of miR-127-5p, the repressor of  $\beta$ -mRNA translation. This could promote the accumulation of masked  $\beta$ -mRNA in the fetal liver ensuring a less functionality of the  $H^+$ -ATP synthase to allow an active glycolysis which is the main pathway of the proliferating hepatocyte [40]. It is likely that the targeting of miR-127-5p to its presumed binding site in the 3'UTR of  $\beta$ -mRNA is an assisted process exerted in cooperation with the RNABPs that built the human  $\beta$ -RNP [11,21]. Post-translational modification of any of these proteins [21] by the cellular signaling events that occur in mammals after birth [57] might induce the release of miR-127-5p from  $\beta$ -mRNA to allow its effective translation and the functional differentiation of human liver mitochondria. Within this context, miR-127-5p could function in human liver development in a similar way to that of miR-378\* in cancer, which has been shown to be an important regulator of the bioenergetic switch experienced in breast cancer for adjusting the cell to a changing metabolic demand [58].

Taken together, our results indicate that translational control of  $\beta$ -mRNA is also operative during human liver development. Since

miR-127-5p is highly expressed in the fetal human liver and targets the 3'UTR of  $\beta$ -mRNA repressing its translation we suggest that it offers a potential candidate for controlling the expression of  $\beta$ -F1-ATPase during development and therefore in regulating the bioenergetic differentiation of human liver mitochondria.

## 5. Conclusion

miR-127-5p targets the 3'UTR of  $\beta$ -F1-ATPase mRNA ( $\beta$ -mRNA) and inhibits its translation without affecting  $\beta$ -mRNA abundance. The expression of  $\beta$ -F1-ATPase is controlled at the level of translation during development of the human liver. Since miR-127-5p is highly expressed in the fetal human liver we suggest that it might be involved in defining the bioenergetic activity of mitochondria in the hepatocyte during development.

## Acknowledgements

We are indebted to Drs. M. Sánchez-Aragó and L. Formentini for suggestions and critical reading of the manuscript. The authors gratefully acknowledge the excellent technical support provided by Dr. M. Aldea, M. Chamorro and C. Nuñez de Arenas. IMW and IMR are the recipients of pre-doctoral fellowships from the Plan de Formación de Profesorado Universitario (AP2007-03035) from the Ministerio de Educación and JAE-CSIC, respectively. The work was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2010-18903), by the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII and by Comunidad de Madrid (S2011/BMD-2402), Spain. The CBMSO receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

## References

- [1] P.D. Boyer, The ATP synthase—a splendid molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997) 717–749.
- [2] J.M. Izquierdo, J.M. Cuezva, Control of the translational efficiency of beta-F1-ATPase mRNA depends on the regulation of a protein that binds the 3' untranslated region of the mRNA, *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 5255–5268.
- [3] M. Corral-Debrinski, C. Blugeon, C. Jacq, In yeast, the 3' untranslated region or the presence of ATM1 is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 7881–7892.
- [4] M.L. de Heredia, J.M. Izquierdo, J.M. Cuezva, A conserved mechanism for controlling the translation of beta-F1-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 7430–7437.
- [5] A. Margeot, C. Blugeon, J. Sylvestre, S. Viallette, C. Jacq, M. Corral-Debrinski, In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function, *EMBO J.* 21 (2002) 6893–6904.
- [6] J. Ricart, J.M. Izquierdo, C.M. Di Liegro, J.M. Cuezva, Assembly of the ribonucleoprotein complex containing the mRNA of the beta-subunit of the mitochondrial H<sup>+</sup>–ATP synthase requires the participation of two distal cis-acting elements and a complex set of cellular trans-acting proteins, *Biochem. J.* 365 (2002) 417–428.
- [7] A.M. Luis, J.M. Izquierdo, L.K. Ostronoff, M. Salinas, J.F. Santaren, J.M. Cuezva, Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver. Specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial beta-F1-ATPase mRNA, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 1868–1875.
- [8] J. Houstek, P. Tvrdik, S. Pavelka, M. Baudysova, Low content of mitochondrial ATPase in brown adipose tissue is the result of post-transcriptional regulation, *FEBS Lett.* 294 (1991) 191–194.
- [9] I.M. Willers, A. Isidoro, A.D. Ortega, P.L. Fernandez, J.M. Cuezva, Selective inhibition of beta-F1-ATPase mRNA translation in human tumours, *Biochem. J.* 426 (2010) 319–326.
- [10] I.M. Willers, J.M. Cuezva, Post-transcriptional regulation of the mitochondrial H<sup>+</sup>–ATP synthase: a key regulator of the metabolic phenotype in cancer, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 543–551.
- [11] A.D. Ortega, I.M. Willers, S. Sala, J.M. Cuezva, Human G3BP1 interacts with beta-F1-ATPase mRNA and inhibits its translation, *J. Cell Sci.* 123 (2010) 2685–2696.
- [12] J.M. Izquierdo, J.M. Cuezva, Internal-ribosome-entry-site functional activity of the 3'-untranslated region of the mRNA for the beta subunit of mitochondrial H<sup>+</sup>–ATP synthase, *Biochem. J.* 346 (2000) 849–855.
- [13] C.M. Di Liegro, M. Bellafiore, J.M. Izquierdo, A. Rantanen, J.M. Cuezva, 3'-untranslated regions of oxidative phosphorylation mRNAs function *in vivo* as enhancers of translation, *Biochem. J.* 352 (2000) 109–115.
- [14] J. Krol, I. Loedige, W. Filipowicz, The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay, *Nat. Rev. Genet.* 11 (2010) 597–610.
- [15] R.C. Lee, R.L. Feinbaum, V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell* 75 (1993) 843–854.
- [16] B.J. Reinhart, F.J. Slack, M. Basson, A.E. Pasquinelli, J.C. Bettinger, A.E. Rougvie, H.R. Horvitz, G. Ruvkun, The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 403 (2000) 901–906.
- [17] G. Stefani, F.J. Slack, Small non-coding RNAs in animal development, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 219–230.
- [18] I. Alvarez-Garcia, E.A. Miska, MicroRNA functions in animal development and human disease, *Development* 132 (2005) 4653–4662.
- [19] R. Garzon, G.A. Calin, C.M. Croce, MicroRNAs in cancer, *Annu. Rev. Med.* 60 (2009) 167–179.
- [20] B. Zhang, X. Pan, G.P. Cobb, T.A. Anderson, microRNAs as oncogenes and tumor suppressors, *Dev. Biol.* 302 (2007) 1–12.
- [21] M. van Kouwenhove, M. Kedde, R. Agami, MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer, *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 644–656.
- [22] M.R. Fabian, N. Sonenberg, W. Filipowicz, Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs, *Annu. Rev. Biochem.* 79 (2010) 351–379.
- [23] S. Vasudevan, Y. Tong, J.A. Steitz, Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation, *Science* 318 (2007) 1931–1934.
- [24] J.I. Henke, D. Goergen, J. Zheng, Y. Song, C.G. Schuttler, C. Fehr, C. Junemann, M. Niepmann, microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA, *EMBO J.* 27 (2008) 3300–3310.
- [25] U.A. Orom, F.C. Nielsen, A.H. Lund, MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation, *Mol. Cell* 30 (2008) 460–471.
- [26] R. Kucharczyk, M. Zick, M. Bietenhader, M. Rak, E. Couplan, M. Blondel, S.D. Caubet, J.P. di Rago, Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches, *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009) 186–199.
- [27] M. Martinez-Diez, G. Santamaria, A.D. Ortega, J.M. Cuezva, Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3'UTRs, *PLoS One* 1 (2006) e107.
- [28] L. Sanchez-Cenizo, L. Formentini, M. Aldea, A.D. Ortega, P. Garcia-Huerta, M. Sanchez-Arago, J.M. Cuezva, Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H<sup>+</sup>–ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 25308–25313.
- [29] J.M. Cuezva, M. Krajewska, M.L. de Heredia, S. Krajewski, G. Santamaria, H. Kim, J.M. Zapata, H. Marusawa, M. Chamorro, J.C. Reed, The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression, *Cancer Res.* 62 (2002) 6674–6681.
- [30] G. Egea, J.M. Izquierdo, J. Ricart, C. San Martín, J.M. Cuezva, mRNA encoding the beta-subunit of the mitochondrial F1-ATPase complex is a localized mRNA in rat hepatocytes, *Biochem. J.* 322 (1997) 557–565.
- [31] B.P. Lewis, C.B. Burge, D.P. Bartel, Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets, *Cell* 120 (2005) 15–20.
- [32] J. Brennecke, A. Stark, R.B. Russell, S.M. Cohen, Principles of microRNA-target recognition, *PLoS Biol.* 3 (2005) e85.
- [33] A. Grimson, K.K. Farh, W.K. Johnston, P. Garrett-Engle, L.P. Lim, D.P. Bartel, MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing, *Mol. Cell* 27 (2007) 91–105.
- [34] R. Kulshreshtha, M. Ferracin, S.E. Wojcik, R. Garzon, H. Alder, F.J. Agosto-Perez, R. Davuluri, C.G. Liu, C.M. Croce, M. Negrini, G.A. Calin, M. Ivan, A microRNA signature of hypoxia, *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 1859–1867.
- [35] C. Valcarce, R.M. Navarrete, P. Encabo, E. Loeches, J. Satrustegui, J.M. Cuezva, Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 7767–7775.
- [36] J.M. Izquierdo, J. Ricart, L.K. Ostronoff, G. Egea, J.M. Cuezva, Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 10342–10350.
- [37] J.M. Cuezva, L.K. Ostronoff, J. Ricart, M. Lopez de Heredia, C.M. Di Liegro, J.M. Izquierdo, Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis, *J. Bioenerg. Biomembr.* 29 (1997) 365–377.
- [38] L.O. Martinez, S. Jacquet, J.P. Esteve, C. Rolland, E. Cabezon, E. Champagne, T. Pineau, V. Georgeaud, J.E. Walker, F. Terce, X. Collet, B. Perret, R. Barbaras, Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis, *Nature* 421 (2003) 75–79.
- [39] P. Acebo, D. Giner, P. Calvo, A. Blanco-Rivero, A.D. Ortega, P.L. Fernandez, G. Roncador, E. Fernandez-Malave, M. Chamorro, J.M. Cuezva, Cancer abolishes the tissue type-specific differences in the phenotype of energetic metabolism, *Transl. Oncol.* 2 (2009) 138–145.
- [40] J.M. Cuezva, A.D. Ortega, I. Willers, L. Sanchez-Cenizo, M. Aldea, M. Sanchez-Arago, The tumor suppressor function of mitochondria: translation into the clinics, *Biochim. Biophys. Acta* 1792 (2009) 1145–1158.
- [41] S.Q. Zheng, Y.X. Li, Y. Zhang, X. Li, H. Tang, MiR-101 regulates HSV-1 replication by targeting ATP5B, *Antiviral Res.* 89 (2011) 219–226.
- [42] S. Bagga, J. Bracht, S. Hunter, K. Massirer, J. Holtz, R. Eachus, A.E. Pasquinelli, Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation, *Cell* 122 (2005) 553–563.
- [43] D.T. Humphreys, B.J. Westman, D.I. Martin, T. Preiss, MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 16961–16966.
- [44] A. Eulalio, F. Triteschler, E. Izaurralde, The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing, *RNA* 15 (2009) 1433–1442.
- [45] E. Davis, F. Caiment, X. Tordoir, J. Cavaille, A. Ferguson-Smith, N. Cockett, M. Georges, C. Charlier, RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted *Rtl1/Peg11* locus, *Curr. Biol.* 15 (2005) 743–749.
- [46] M. Bhaskaran, Y. Wang, H. Zhang, T. Weng, P. Baviskar, Y. Guo, D. Gou, L. Liu, MicroRNA-127 modulates fetal lung development, *Physiol. Genomics* 37 (2009) 268–278.

- [47] Y. Saito, G. Liang, G. Egger, J.M. Friedman, J.C. Chuang, G.A. Coetzee, P.A. Jones, Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells, *Cancer Cell* 9 (2006) 435–443.
- [48] J.L. Robertus, G. Harms, T. Blokzijl, M. Booman, D. de Jong, G. van Imhoff, S. Rosati, E. Schuurink, P. Kluin, A. van den Berg, Specific expression of miR-17-5p and miR-127 in testicular and central nervous system diffuse large B-cell lymphoma, *Mod. Pathol.* 22 (2009) 547–555.
- [49] E. Leucci, A. Onnis, M. Cocco, G. De Falco, F. Imperatore, A. Giuseppina, V. Costanzo, G. Cerino, S. Mannucci, R. Cantisani, J. Nyagol, W. Mwanda, R. Iriso, M. Owang, K. Schurfeld, C. Bellan, S. Lazzi, L. Leoncini, B-cell differentiation in EBV-positive Burkitt lymphoma is impaired at posttranscriptional level by miRNA-altered expression, *Int. J. Cancer* 126 (2010) 1316–1326.
- [50] J.M. Cuezva, M. Sanchez-Arago, S. Sala, A. Blanco-Rivero, A.D. Ortega, A message emerging from development: the repression of mitochondrial beta-F1-ATPase expression in cancer, *J. Bioenerg. Biomembr.* 39 (2007) 259–265.
- [51] L. Minai, J. Martinovic, D. Chretien, F. Dumez, F. Razavi, A. Munnich, A. Rotig, Mitochondrial respiratory chain complex assembly and function during human fetal development, *Mol. Genet. Metab.* 94 (2008) 120–126.
- [52] M. Pejznochova, M. Tesarova, H. Hansikova, M. Magner, T. Honzik, K. Vinsova, Z. Hajkova, V. Havlickova, J. Zeman, Mitochondrial DNA content and expression of genes involved in mtDNA transcription, regulation and maintenance during human fetal development, *Mitochondrion* 10 (2010) 321–329.
- [53] G. Song, L. Wang, A conserved gene structure and expression regulation of miR-433 and miR-127 in mammals, *PLoS One* 4 (2009) e7829.
- [54] R.C. Scarpulla, Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 611–638.
- [55] V.K. Mootha, C. Handschin, D. Arlow, X. Xie, J. St Pierre, S. Sihag, W. Yang, D. Altshuler, P. Puigserver, N. Patterson, P.J. Willy, I.G. Schulman, R.A. Heyman, E.S. Lander, B.M. Spiegelman, *Erralpha* and *Gabpa/b* specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 6570–6575.
- [56] S.N. Schreiber, R. Emter, M.B. Hock, D. Knutti, J. Cardenas, M. Podvinec, E.J. Oakeley, A. Kralli, The estrogen-related receptor alpha (*ERRalpha*) functions in *PPARgamma* coactivator 1alpha (*PGC-1alpha*)-induced mitochondrial biogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 6472–6477.
- [57] F. Mayor, J.M. Cuezva, Hormonal and metabolic changes in the perinatal period, *Biol. Neonate* 48 (1985) 185–196.
- [58] L.J. Eichner, M.C. Perry, C.R. Dufour, N. Bertos, M. Park, J. St-Pierre, V. Giguere, miR-378( \*) mediates metabolic shift in breast cancer cells via the *PGC-1beta/ERRgamma* transcriptional pathway, *Cell Metab.* 12 (2010) 352–361.