



Programa de Doctorat de BIOMEDICINA  
Bienni 2001-2003

## **Expressió de la 6-fosfofructo-2 cinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa en el teixit testicular.**

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Ramon Bartrons i Bach i la Dra. Àurea Navarro-Sabaté a la Unitat de Bioquímica del Departament de Ciències Fisiològiques II de la Universitat de Barcelona.

Els directors de tesi:

Marta Gómez Martínez      Dr. Ramon Bartrons i Bach      Dra. Àurea Navarro-Sabaté

Memòria presentada per Marta Gómez Martínez  
per a optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona.  
L'Hospitalet de Llobregat, setembre de 2008



---

Sí em dius "et vull",  
que el sol faci el dia molt més llarg, i així, robar  
temps al temps d'un rellotge aturat.

Que tinguem sort,  
que trobem tot el que ens va mancar ahir.

I així pren, i així pren, tot el fruit que et pugui donar  
el camí que, a poc a poc, escrius per a demà.  
Què demà, que demà mancarà el fruit de cada pas;  
per això, malgrat la boira, cal camínar.

Sí véns amb mí,  
no demanis un camí planer,  
ní estels d'argent,  
ní un demà ple de promeses, sols  
un poc de sort,  
i que la vida ens doni un camí  
ben llarg.

---

Què tinguem sort! Lluís Llach

A los familiares y amigos que me han  
acompañado en este largo camino.

Al Señor Daniel.

A Xiki.



---

...Voici mon secret. Il est très simple: on ne voit bien qu'avec le coeur. L'essentiel est invisible pour les yeux. – dit le renard.

---

Le Petit Prince.

Antoine de Saint- Exupéry.

Ya se sabe, todo buen viaje tiene un principio y un final. Y sí, ha llegado el terrible momento para mí de escribir los agradecimientos de la tesis. Digo terrible no porque no tenga nada que agradecer sino que para una persona parca en palabras como yo es un momento difícil. Así que es la hora de manifestar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, directa o indirectamente, me han ayudado a realizar esta tesis doctoral.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a Ramon, por la confianza que un día depositaste en mí para desarrollar este proyecto, por acogerme en tu laboratorio, por tus consejos, por tu paciencia y por tu comprensión en los momentos difíciles.

A Àurea, *la bruixa avorrida*, que no eres ni bruja, ni aburrída. Gracias por las largas horas que hemos pasado “discutiéndonos” en tu despacho, proyectando experimentos y machacando resultados. Por tus innumerables consejos científicos y personales, por ser la mano ejecutora de los experimentos con animales, por tu vitalidad, energía y capacidad de llevar a la par miles y miles de cosas. Por ser mi Norte cuanto más perdida estaba. Por todo esto y mucho más, ¡gracias!

Recuerdo vagamente mi primer día en el laboratorio. Àurea diciéndome no se qué de un PAC de DNA que todavía tenía que llegar y que mientras lo esperaba me pusiese a hacer una Maxi con Mercè. Ahí estábamos las dos, mirando la caja de Maxís sin saber por dónde comenzar. Porque, claro está, ninguna tenía idea de qué había en aquella caja y como se tenían que mezclar aquellos extraños líquidos. Y así fue como comencé, con una Maxi y de la mano de Mercè que iba diciendo “mira que dec ser important que m’han posat una ajudanta”. Cè muchas gracias por todo, en realidad no se por dónde comenzar. Las risas y bromas de los cursos de doctorado, los congresos compartidos con sus vinitos y pérdidas de póster incluídas, los colacaos y rícolas buenas-noches de media tarde. Gracias por tu saber escuchar y tus

buenos consejos. Yo tampoco me olvido del "POR DIOS ERAS..." en Trafalgar Square. Gràcies Bessona.

Todos los comienzos siempre son iguales, están llenos de ilusión, de esperanza y de incertidumbre ante lo desconocido que se avecina. El mío fue un poco regular, hubieron no ligaciones, purificaciones digestivas, y una serie de fenómenos parasitológicos difíciles de explicar. Menos mal que para amenizarlos estabas ahí Joan. Contigo todas fuimos misses hablando el inglés, yes, yes!! Nos llevaste a la ópera y trajiste lo mejor de los carnavales de Sitges al laboratorio. Gracias por tu buen humor y alegría. Eres un soplo de aire fresco. Gràcies Bessona.

Nieves, aunque hayamos tenido nuestras discrepancias en el pasado, gracias por tu ayuda experimental con las fructosas, por las filosofadas en el metro y sobretodo gracias por haber ampliado el panorama musical del laboratorio. Laura y Miguel, los "nuevos del laboratorio", espero que aprendáis mucho y disfrutéis de la experiencia tanto como yo. Gracias Anna por tu ayuda y buena disposición. Marta y Susagna, por vuestra visita fugaz.

No cabe la menor duda de que el laboratorio 4165 no sería el mismo sin tí Esther. Gracias por facilitarnos el día a día, gracias por tus consejos, por tus historias de la vida. Por las cenas en el Rosal. Por aguantar a Ismael.

A los hermanos de Biofísica, Alis, ¿qué puedo decirte? Gracias por tus consejos, por los colacaos, por los cines, por las cervecitas y las bravas compartidas, por escuchar mis neuras, por bajarme los pies al suelo y darme otras perspectivas. Simplemente gracias por estar ahí. Anna, eres digna de admiración. Una tesis, dos hijos pequeños y siempre con la sonrisa puesta. Gracias por transmitir paz y serenidad. ¡Yo de mayor quiero ser como tú! Gracias también al resto del grupo; Francesc y Andy sabéis que la biblío es vuestra, Roser has sido la única que se atrevió a cortarse el pelo al estilo Llongueras, Edu y Jordi fuisteis mis proveedores de animales, Sandra y Jana merci por las conversaciones en el metro. Como no, también a los jefes del grupo, Teresa, Jordi y José Carlos. Pepe eres como el libro gordo de Petete, sabes de todo y sabes bien. Es un placer oírte hablar y filosofar en la salita del café, siempre en busca de una víctima que te siga el juego...María, ieres un sol!

Síguenos por orden. A la gente del 4171, a todos los presentes y a todos los ausentes. A las niñas del lab; Roser, M<sup>a</sup> José y Cristina, inmenudo tandem de tres que soís!, gracias por las

salidas de nenas, los teatros, la hora de la comida en la salita del café, por la paciencia cuando monopolizó la máquina de las lucíferasas o la campana de cultivos (que no son pocas). A los niños del lab; Antonio, Arnau, Pol y Eddy; que ponéis el equilibrio a tanta fémína. Antonio siempre te recordaré corriendo tras el tranvía, cantando o bailando con Fangoria mientras alguna incubación. También a los ausentes, Raquel, Cristina Gómez, Sílvia, Bea y Cristina Lacasa, con quienes he compartido experimentos, salidas y esquiadas. Júlia, siempre es un placer escucharte y tratarte. No quiero dejarme a los jefes de grupo, Santiago, Francesc Ventura i Francesc Vinyals, que me han ayudado y aconsejado siempre que me he encallado.

A la gente del 4175. Los cursos de doctorado sin Antonio y Llorenç no hubiesen sido lo mismo, la verdad es que conseguisteis sacarme los colores más de una vez. Aún no entiendo como no nos echaron de clase aquel día de la chica sentada en la silla.... Chicos, de vosotros me llevo una imagen impactante: Antonio conduciendo el coche por la Diagonal, mejor dicho, cruzando los carriles de tres en tres y Llorenç sacando medio cuerpo por la ventana para pararle el tráfico... ¡pá habernos matao! Junto con Dani habéis formado el trío calavera del laboratorio, dotándolo de personalidad propia. Gracias por ser como soís, gracias por los conciertos compartidos, me ha encantado este tiempo con vosotros. Dani, ¡saca los 50 céntimos! Para compensar a tanto chico suelto, el laboratorio necesitaba unas chicas de aupa. Mercè, Ana M<sup>a</sup>, Diana, Camila y Alba, que junto con Montse y Clara habéis sabido lidiar con tanta testosterona. Gracias por las comidas, por escucharme cuando me daba alguna neura y porque estáis en el momento preciso. Gracias a Joan y a Biel por el grupo que han formado.

A la gente del 4114. Edu, Ouadah, Irantzu y Fabiola, gracias por pasarme anticuerpos, por los consejos del Western gigante, por ofrecerme cuando no hay quien venga a prácticas. Por que ilo mismo pá un roto que pá un descosío! José Luis gracias por tu grupo y por tus consejos con los anticuerpos.

A las chicas del 4108; Ruth, Roser, Tatiana y Alba, y a sus jefas Avelina y Pepita. Gracias por enseñarme los trucos de las inmunes y por ponerme en contacto con el servicio de Patología del Hospital, a quien he de agradecer las muestras de tumores humanos.

A Esther y a Benja, gracias chicos por vuestra inestimabilísima ayuda con las PCRs y las fluorescencias... ¡qué se me han resistido! ¡Sabéis que esa parte de la tesis es toda vuestra?

A mis amigas de siempre. A las biólogas, Bea, Cris, Mercè y Marta. Gracias por vuestros consejos en los momentos de dudas, por vuestros ánimos cuando creía desfallecer y sobretodo por haber estado siempre ahí, a un golpe de teléfono, tomando un café o alrededor de unas bravas. Éstas últimas son mis niñas de l'hospí, Montse y Maíte. Nenas, gracias por aguantarme con las neuras de las tacas que aparecen o que no aparecen (ilas que más!). Mon, aún guardo el decálogo que hicimos...Y sobretodo, ¡¡¡gracias por aquel finde en París!!! Sergio, no olvido que también estabas. Gracias por estar cuando más os he necesitado (lágrima resbalando por la mejilla, casi). A Laia y a Marta, gracias por los viajes de Pumuki llenos de risas y fotos extrañas, y sobretodo por haber soportado mi mal humor y los nervios de los últimos tiempos. A todas mis niñas, ¡a partir de ahora sólo vamos a compartir momentos de alegría!

A mis otras amigas, Belén, Mila y Natsumi. Gracias por los días pasados en Francia, Cádiz o Río y por todos los días que aún nos quedan por vivir. Por el príncipito. Merci David et Dorothee pour le temps qu'on a partager.

Y mi mayor agradecimiento, por supuesto, a mi familia.

Padres, gracias por todo. Por darme libertad de pensamiento. Por la educación que me habéis dado. Por las ganas de aprender. Porque el saber no ocupa lugar. Porque a pesar de no entender nada de qué es lo que hago siempre habéis respetado mis decisiones, me habéis apoyado y me habéis ayudado en todo lo posible. Por los pasodobles que vendrán. Porque os quiero.

Gracias Asun y Kike (mi tata y mi tato) gracias por vuestras bromas, por vuestro interés en mi trabajo con los "bichines", por los viajes que hemos hecho, por las comidas-cenas que aún nos quedan. Por estar a mi lado.

Gracias Xiki. Por esa alegría que transmítes. Porque eres capaz de hacer remontar un mal día sólo con tenerte cerca. Porque disfruto los sábados. Por tu sensibilidad que envidio (aunque te diga que hay que ser fuerte). Porque me gusta la persona en que te has convertido.







# Continguts

<b>1.- INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>0</b>
1.1.-Organització testicular. ....	1
1.2.- Espermatogènesi .....	2
1.3.- Estadis del cicle espermatogènic. ....	4
1.4.- Regulació hormonal de l'espermatogènesi.....	6
1.5.- Importància de les cèl·lules de Sertoli a l'espermatogènesi.....	9
1.6.- Metabolisme energètic de les cèl·lules testiculars.....	13
1.7.- L'enzim 6-fosfofructocinasa-1.....	20
1.8.- Fructosa 2,6-bisfosfat. ....	21
1.9.- L'enzim 6-fosfofructocinasa-2 / fructosa-2,6-bisfosfatasa.....	23
1.10.- Isoenzims de la PFK-2/FBPasa.....	25
1.11.- El gen Pfkfb3 .....	27
1.12.- El gen Pfkfb4 .....	29
1.12. Expressió i regulació gènica durant l'espermatogènesi.....	31
<b>2.- OBJECTIUS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.- RESULTATS</b> .....	<b>41</b>
ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE PFK-2/FBPASA-2 EN TESTICLE. ....	43
INTRODUCCIÓ .....	44
RESULTATS .....	47
Producció d'anticossos policlonals específics contra la PFKFB4.....	47
Estudi de l'expressió del gen Pfkfb4 per RT-PCR en els teixits adults de rata. ....	51
Estudi de l'expressió dels gens Pfkfb3 i Pfkfb4 en el testicle adult de rata .....	52
Estudi de l'expressió dels gens Pfkfb3 i Pfkfb4 al testicle en desenvolupament.....	53
Estudi de l'expressió de PFKFB3 i PFKFB4 en les cèl·lules aïllades de testicle.....	60
Immunofluorescència durant el desenvolupament del testicle.....	61
Estudi de l'expressió de PFKFB3 i PFKFB4 als espermatozoides.....	65
Expressió de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en tumors de testicle humà .....	68
DISCUSSIÓ .....	74
CLONATGE, CARACTERITZACIÓ I REGULACIÓ DEL PROMOTOR DEL GEN PFKFB4 .....	81
INTRODUCCIÓ .....	82
RESULTATS .....	82
Caracterització de l'inici de transcripció del gen Pfkfb4 humà.....	82
Anàlisi de la seqüència corresponent a la regió promotora del gen Pfkfb4.....	84
Clonatge de diversos fragments de la regió promotora del gen Pfkfb4 .....	86
Transfeccions transitòries en línies cel·lulars.....	89
Caracterització de la regió mínima promotora.....	91
Estudi de la resposta del promotor al sèrum i als èsters de forbol.....	92
Hipòxia i testicle, efectes sobre tPFK-2.....	94
HIF-1.....	94
Efectes de la hipòxia en l'expressió de l'enzim tPFK-2 en cèl·lules de testicle.....	98
Resposta dels plasmidis d'expressió luciferasa al tractament amb clorur de cobalt.....	99
HIF1 $\alpha$ com a mediador de la resposta a la hipòxia del promotor del gen Pfkfb4.....	102
SP-1.....	103

<i>Efectes del factor Sp1 en la regulació transcripcional del gen Pfkfb4</i> .....	105
<i>Possible cooperació entre el factor de transcripció Sp1 i la hipòxia</i> .....	107
<i>c-MYC</i> .....	109
<i>Efectes del factor c-Myc en la regulació transcripcional del gen Pfkfb4</i> .....	111
<i>Possible interacció entre c-Myc i la hipòxia en la regulació de la transcripció de Pfkfb4</i> .....	113
<i>Possible relació entre els factors de transcripció HIF 1<math>\alpha</math>, Sp1 i c-Myc</i> .....	116
<i>DISCUSSION</i> .....	119
<b>ACCIÓ PARACRINA DE LES CÈL·LULES DE SERTOLI SOBRE PFKFB3 I PFKFB4</b> .....	125
<i>INTRODUCCIÓ</i> .....	126
<i>RESULTATS</i> .....	129
<i>Relació entre les hormones esteroïdals i el gen Pfkfb4</i> .....	129
<i>Role de les cèl·lules de Sertoli en la regulació de l'expressió de les proteïnes PFKFB3 i PFKFB4</i> .....	132
<i>Localització d'algun possible element de resposta al medi condicionat en el promotor Pfkfb4</i> .....	137
<i>DISCUSSION i PERSPECTIVES FUTURES</i> .....	141
<b>4. - DISCUSSION</b> .....	147
<i>4.1.- Metabolisme a les cèl·lules germinals i PFK-2/FBPasa-2</i> .....	149
<i>4.2.- Regulació transcripcional de Pfkfb4 en les cèl·lules germinals, relació amb la hipòxia</i> .....	154
<i>4.3.- Regulació hormonal de Pfkfb4 a les cèl·lules germinals i relació amb les cèl·lules de Sertoli</i> .....	166
<b>5. - CONCLUSIONS</b> .....	173
<b>6. - MATERIAL I MÈTODES</b> .....	179
<b>7. - BIBLIOGRAFIA</b> .....	219
<b>8. - PUBLICACIONS</b> .....	235





## ABREVIATURES

---

Akt	Proteïna cinasa B
AMP	Adenosina monofosfat
AP-2	<i>Activator protein 2</i>
ArKO	Ratolins deficients pel receptor d'andrògens
AR	Receptor d'andrògens
ARE	Element de resposta als andrògens
ARNT	<i>Aryl Hydrocarbon receptor nuclear translocator</i> (=HIF $\beta$ )
ATP	Adenosina trifosfat
BCM	Medi condicionat basal
bHLH-PAS	Domini bàsic-hèlix-Loop-hèlix Per/Arnt/Sim
BHT	Barrera Hemato-Testicular
CM	Medi condicionat de Sertoli
CoCl <sub>2</sub>	Clorur de cobalt
DHT	5 $\alpha$ -dihidrotestosterona
EGF	Factor de creixement epidèrmic
EGFR	Receptor del factor de creixement epidèrmic
ER	Receptor d'estrògens
ERE	Element de resposta als estrògens
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FBPasa-1	Fructosa-1,6-bisfosfatasa
FBPasa-2	Fructosa-2,6-bisfosfatasa
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FS	<i>Fibrous sheath</i>
FSH	Hormona estimulant del fol·licle
Fru-6-P	Fructosa-6-fosfat
Fru-1,6-P <sub>2</sub>	Fructosa-1,6-bisfosfat
Fru-2,6-P <sub>2</sub>	Fructosa-2,6-bisfosfat
GAPDH	Gliceraldehid 3 fosfat deshidrogenasa
GC	Cèl·lula germinal
GC-1 spg	Espermatogòni B de ratolí
GC-2 spd(ts)	Espermatòcit premeiòtic de ratolí
GFP	<i>Green fluorescen protein</i>
Glu-6-P	Glucosa-6-fosfat
GLUT	Transportador de glucosa
GnRH	<i>Hypogonadal mouse</i>
GRE	Element de resposta a glucocorticoids
HIF-1	Factor induïble per hipòxia

HK	Hexocinasa
HRE	Element de resposta a hipòxia
IGF	<i>Insulin growth factor</i>
kDa	Kilodaltons
LDH	Lactat deshidrogenasa
LH	Hormona Luteinizant
L-PFK-2	Proteïna PFKFB1
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
mEF	Fibroblats embrionaris de ratolins
MCT	Transportador de monocarboxilases
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
PDB	Ésters de forbol
PEP	Fosfoenolpiruvat
PGK2	Fosfoglicerat cinasa-2
PK	Piruvat cinasa
PKA	Proteïna cinasa depenent d'AMP cíclic
PKC	Proteïna cinasa C
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-cinasa
PFK-1	6-fosfofructocinasa-1
PFK-2	6-fosfofructocinasa-2
PK	Piruvat cinasa
5'-RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
S	Sertoli
SCM	Medi condicionat amb sèrum
SRE	Element de respota a les proteïnes Sox
SP-1	<i>Specific protein 1</i>
TCM	Medi condicionat amb testosterona
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TM-4	Cèl·lula de Sertoli de ratolí
TSC	Supressor tumoral
TSS	<i>Transcriptional start site</i>
tPFK-2	Proteïna PFKFB4
uPFK-2	Proteïna PFKFB3
S6K	<i>p70 S6Kinase</i>
5'-UTR	<i>5'--Untranslated region</i>







---

## 1.- INTRODUCCIÓ

---

*Vértigo, que el mundo pare, que corto se me hace el viaje  
(...)*

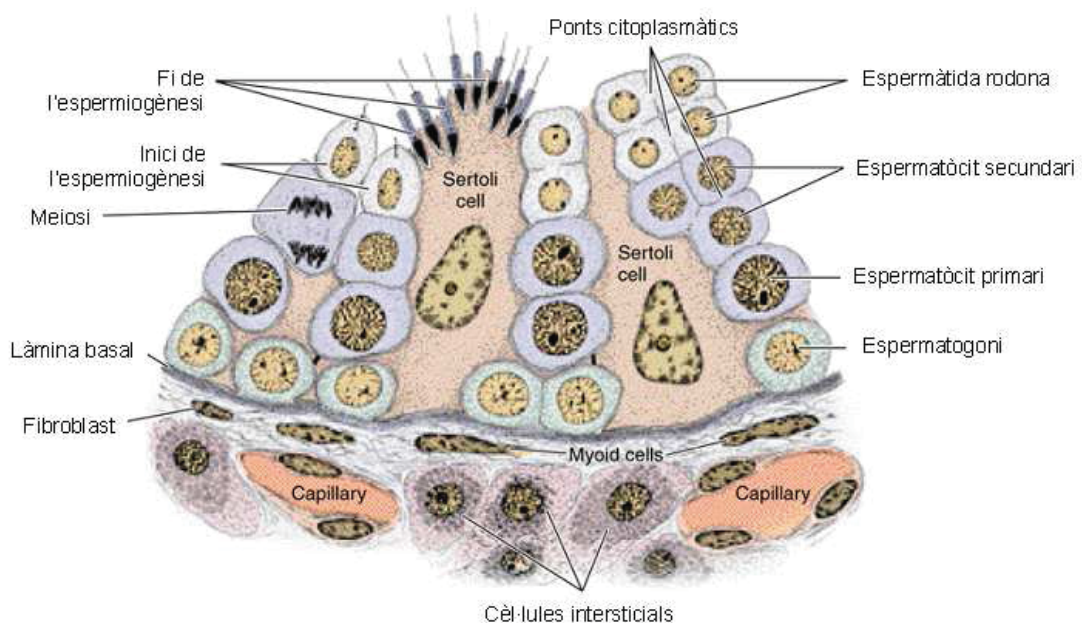
*Que el vértigo pase y que en vuestras ventanas  
luzca el sol cada mañana  
(Vértigo. Ismael Serrano)*



## 1.1.-Organització testicular.

El testicle és l'òrgan reproductor masculí, té dues funcions principals: la producció d'hormones responsables del manteniment de les funcions reproductives i la producció d'espermatozoides, encarregats de transmetre els gens paterns a l'embrió i responsables de la conservació de l'espècie (Russell et al., 1990). Les funcions testiculars es troben localitzades en dos compartiments morfològicament diferenciats: l'espai intersticial i un gran número de túbuls seminífers espiralitzats. L'espai intersticial és el menor dels compartiments i està format, principalment, per teixit vascular, limfàtic i connectiu. També hi ha macròfags, fibroblastes i les cèl·lules de Leydig, que s'encarreguen de secretar les hormones. Els túbuls seminífers formen el compartiment major, contenen les cèl·lules germinals, en continua diferenciació, intercalades entre les cèl·lules de Sertoli. Aquests compartiments estan separats estructural i fisiològicament per barreres cel·lulars que es desenvolupen durant la pubertat. Aquestes barreres constitueixen la Barrera Hemato-Testicular (Russell et al., 1990), la qual protegeix les cèl·lules germinals de l'acció de possibles agents químics nocius.

En un esquema d'una secció de testicle es pot distingir l'estructura interna d'un túbul seminífer i de l'espai intersticial.



**FIGURA 1. Esquema de l'estructura d'un túbul seminífer.** Les diferents cèl·lules germinals en proliferació (espermatogonis, espermatòcits i espermatides rodones) ocupen successius nivells dins l'epiteli. Les espermatides en elongació ocupen els espais que deixen les cèl·lules de Sertoli, les quals s'estenen des de la làmina basal fins al lumen i mantenen contactes amb les cèl·lules germinals. Adaptat de: l'atlas *Basic Histology*, Mc Graw Hill.

A l'esquema de la Figura 1 s'observen quatre compartiments diferents: vascular, intersticial, basal i adluminal. Una membrana basal que conté les cèl·lules mioïdes, així com fibroblastes, separa l'espai intersticial i els compartiments basals. A l'espai intersticial es localitzen els vasos i les cèl·lules de Leydig. Dins els túbuls es troben els compartiments basals i adluminal. Aquests compartiments estan separats per complexes d'unió gap, que mantenen unides a les cèl·lules de Sertoli. En el compartiment basal es troben els espermatogonis, mentre que, en el compartiment adluminal es troben els espermatòcits, les espermatides rodones i els espermatozoides, en íntim contacte amb les cèl·lules de Sertoli mitjançant unions especials (Russell et al., 1990).

## 1.2.- Espermatogènesi

L'espermatogènesi és el procés pel qual els espermatogonis produeixen els espermatozoides; té lloc als túbuls seminífers i es pot dividir en tres fases (Hess, 1999; Russell et al., 1990):

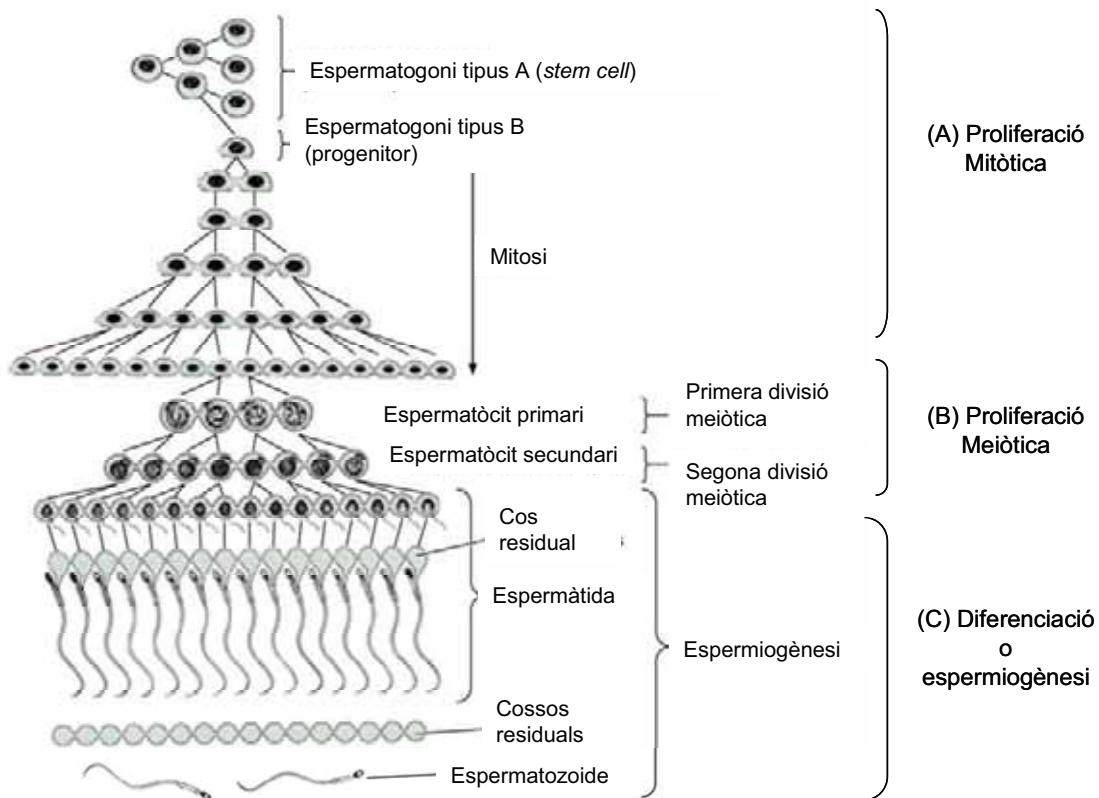
### A) PROLIFERACIÓ MITÒTICA

Els espermatogonis, que constitueixen la primera fase, són les cèl·lules germinals més immadures i estan localitzades a la base dels túbuls seminífers. Prolifereixen per mitosi i es multipliquen repetida i contínuament, reomplint d'aquesta manera l'epiteli germinal. Són capaces d'autoregenerar-se produint, d'una banda, cèl·lules mare (*stem cells*) que romandran als túbuls seminífers i, d'altra banda, les cèl·lules que prosseguiran amb el procés espermatogènic (espermatogonis tipus A i tipus B) que donaran lloc a la primera cèl·lula de la segona fase, l'espermatòcit primari, el qual migra des de la base del túbuls cap al lumen creuant les unions Sertoli-Sertoli.

### B) FASE MEIÒTICA

Les cèl·lules formades amb la divisió dels espermatogonis B són els espermatòcits primaris en fase de preleptotè (PI). Aquesta fase comporta dues divisions meiòtiques. A la primera divisió meiòtica, anomenada profase, cada PI experimenta una sèrie de canvis morfològics amb canvis de grandària tant del citoplasma com del nucli (Russell et al., 1990). Els canvis nuclears són la base morfològica de la seva subdivisió durant la profase meiòtica, així els diferents estats maduratius d'aquesta divisió serien: leptotens (L), zigotens (Z), paquitens (P) i diplotens (D); respectivament. Aquestes darreres són els espermatòcits primaris més grans i també el tipus cel·lular més gran de la línia germinal. El resultat d'aquesta primera divisió meiòtica són dos espermatòcits secundaris per cada PI, cadascun dels quals conté un nombre senzill de cromosomes (2n) i cada cromosoma consta

de dues cromàtides unides pel centròmer. A la segona divisió meiótica aquests espermatòcits secundaris donaran lloc a espermàtides rodones haploides.

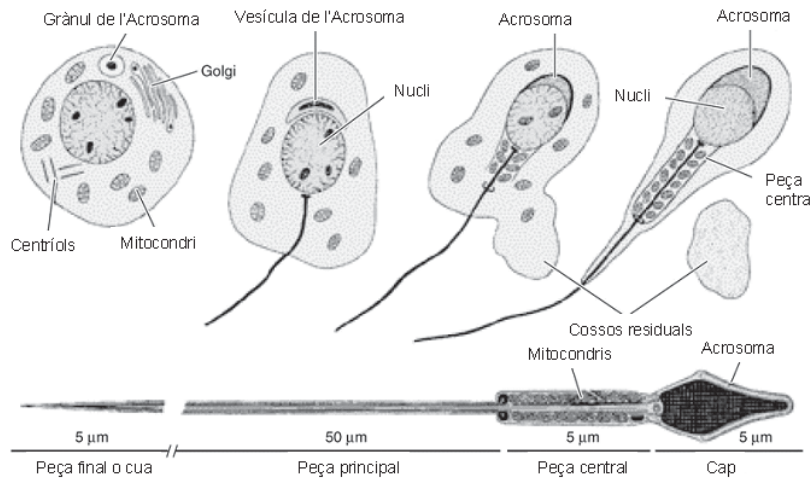


**FIGURA 2. Esquema de l'espermatogènesi en mamífers.** Es mostren les tres principals fases: la fase proliferativa per mitosi, la fase meiótica i l'espermiogènesi, que són desenvolupades pels espermatogonis, els espermatòcits i les espermàtides, respectivament. Modificat de: *l'atlas Basic Histology*, Mc Graw Hill.

### C) DIFERENCIACIÓ o ESPERMIOGÈNESI.

En aquesta fase, les espermàtides rodones haploides passen per un extens procés de diferenciació terminal anomenat espermiogènesi. Durant la remodelació citoplasmàtica s'hi inclouen tres modificacions principals (Figura 3):

1. El nucli s'allarga i la cromatina es condensa en una estructura molt densa, de forma característica segons l'espècie de l'animal, gràcies al canvi de les histones per les protamines (Hecht, 1998).
2. L'aparell de Golgi produeix uns grànuls que donaran lloc a l'acrosoma. Aquesta nova estructura conté els enzims hidrolítics necessaris per la interacció espermatozoide-òvul i la posterior fertilització.
3. Finalment, es desenvolupa el flagel, dotant de moviment a l'espermatozoide. A la peça central del flagel s'hi troben els mitocondris. En aquest moment es perd l'excés de citoplasma, conegut com a cos residual, que és fagotitzat per les cèl·lules de Sertoli.



**FIGURA 3. Esquema en detall del procés espermiogènic a humans.** Es representa les transformacions que pateix una espermatida immadura fins a convertir-se en un espermatozoide madur. Adaptat de: l'atlas *Basic Histology*, Mc Graw Hill.

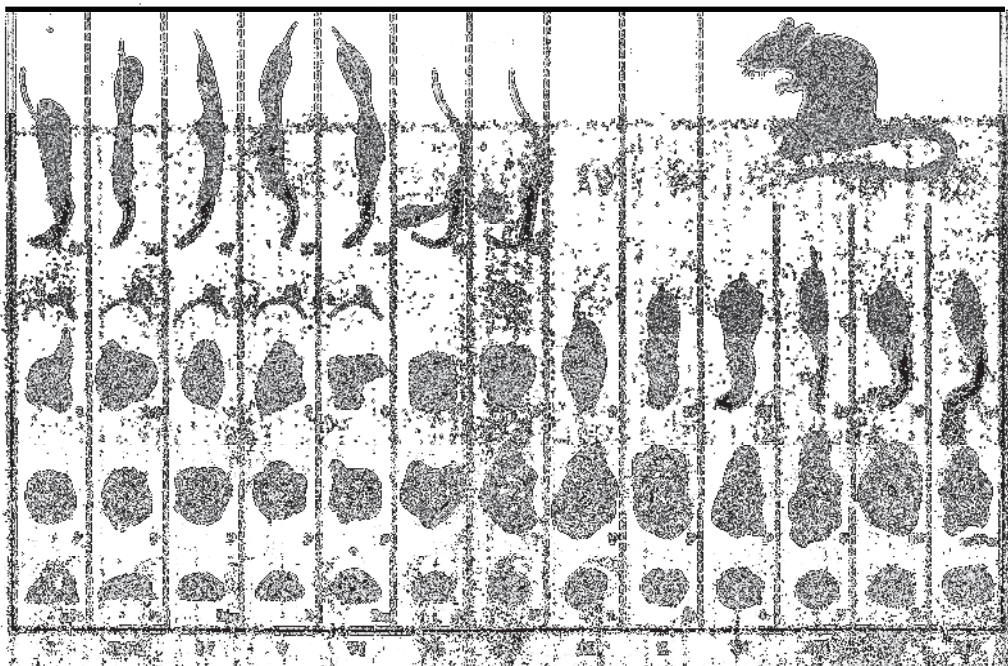
### 1.3.- Estadis del cicle spermatogènic.

L'espermatogènesi és un procés proliferatiu sincrònic que permet la progressió de les cèl·lules germinals en diferenciació al llarg del túbul seminífer. La classificació de les fases de l'espermatogènesi es basa en l'estudi de seccions transversals dels túbuls seminífers, els quals contenen els diferents tipus de cèl·lules germinals disposades en capes, més o menys, concèntricament dins el túbul. En general, les cèl·lules més madures i diferenciades es localitzen més allunyades de la membrana basal i es troben associades amb les cèl·lules més joves que encara han de dividir-se i madurar, les quals s'ubiquen més pròximes a la membrana basal (Hess, 1999; Russell et al., 1990).

Per tant, cada cèl·lula germinal està relativament sincronitzada en el desenvolupament amb les cèl·lules germanes, tant amb les precedents com amb les descendents, mitjançant l'establiment d'associacions i/o agrupacions entre elles durant una mateixa fase del desenvolupament. L'agrupament dels diferents tipus cel·lulars en un moment concret del desenvolupament es coneix com a **associació cel·lular o estadi** (Parvinen et al., 1986). Tots els estadis tenen lloc en un temps i en un segment de l'epiteli determinat i es caracteritzen per tenir una composició constant de cèl·lules germinals, a la rata s'han designat 14 estadis. Per conveni, els diferents estadis s'anomenen seguint la numeració romana. Es pot seguir tot el procés espermatogènic examinant seccions histològiques dels túbuls seminífers i comparant-les amb un mapa del cicle de l'espermatogènesi. Per tal de definir les



diferents fases s'utilitza com a referència els canvis morfològics de les espermatides (canvis en l'acrosoma i en la morfologia del Nucli, veure Figura 3) ja que són fàcilment identificables al microscopi a partir de seccions histològiques al microscopi. Cada tipus cel·lular d'espermàtida identificat d'aquesta manera defineix una etapa de l'espermioogènesi i cada etapa es designa amb números aràbics (Russell et al., 1990). A la Figura 4 es representa el mapa del cicle espermatogènic de la rata. S'ha triat aquest com a model, d'una banda perquè va ser el model animal amb que es va treballar en aquesta tesi doctoral i de l'altra perquè als primats, incloent l'home, l'espermatogènesi és dóna d'una manera més desordenada, és a dir, que en una mateixa secció transversal d'un túbul seminífer es poden trobar representats més d'un estadi diferent.



**FIGURA 4.** Mapa del cicle espermatogènic de la rata. Les columnes verticals, designades amb números romans, indiquen els estadis. Un cicle, és una sèrie completa d'associacions cel·lulars que se succeeixen seguint un ordre lògic. La progressió d'una cèl·lula en desenvolupar-se se segueix horitzontalment fins al final dret del mapa. Llavors, la progressió continua a l'esquerra del mapa amb una posició per sobre. El mapa del cicle acaba amb la fi de l'espermiació (Russell et al., 1990).

Aquesta manera sincrònica d'evolucionar al llarg del temps dóna lloc a un cicle que comença amb l'entrada dels espermatogonis a la mitosi i acaba amb la sortida dels túbuls dels nous espermatozoides, aproximadament cada 4.5 cicles els espermatogonis esdevenen espermatozoides a les rates, en temps serien més de 2 setmanes (Hess, 1999). La coordinació en el cicle pot explicar-se perquè les cèl·lules germinals (des dels espermatogonis fins a les espermatides) es troben connectades per unions intracitoplasmàtiques. Com a resultat es dóna un desenvolupament clonal de les cèl·lules germinals que es divideixen formant una espècie de sinciti. La interconnexió entre les

cèl·lules germinals facilita la comunicació entre elles, és a dir, el pas dels senyals per avançar en el procés espermatogènic a l'hora que també els dilueix.

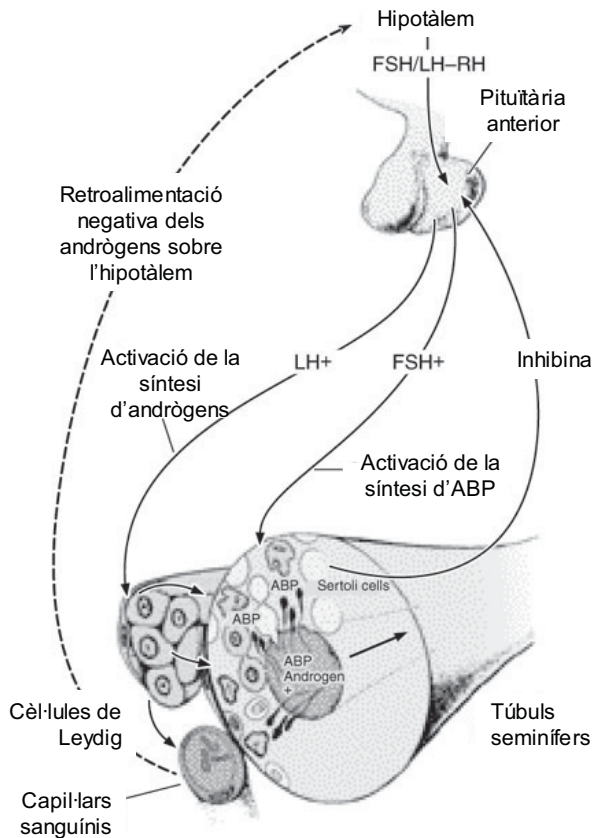
### 1.4.- Regulació hormonal de l'espermatogènesi

A més de produir els espermatozoides, el testicle produeix algunes de les hormones necessàries per mantenir diverses funcions del cos, entre elles es troben les funcions sexuals secundàries. L'espermatogènesi està altament regulada mitjançant un mecanisme hormonal, amb senyals endocrins i paracrins, que determina la proliferació, la diferenciació i la supervivència de les cèl·lules germinals, que no comença a funcionar fins a la pubertat de l'individu. El funcionament normal de l'espermatogènesi requereix d'un sistema hipotalàmic-hipofisari totalment funcional que reguli i generi les hormones gonadotropines (McLachlan, 2000; Sharpe et al., 1994; Weinbauer and Nieschlag, 1993). La glàndula pituïtària, sota l'estimulació de l'hipotàlem, secreta les dues principals hormones gonadotrofines reguladores de l'espermatogènesi: l'hormona luteinizant (LH) i l'hormona estimulant del fol·licle (FSH), Figura 5.

- L'hormona luteinizant, **LH**, controla de forma indirecte l'espermatogènesi. Estimula l'esteroidogènesi a les cèl·lules de Leydig, és a dir, la síntesi i la secreció dels andrògens, concretament de la **testosterona** que, al seu torn, actua sobre els receptors d'andrògens presents a les cèl·lules de Sertoli per tal de controlar l'inici de l'espermatogènesi. A més a més, el nivell circulant d'aquesta hormona (Testosterona) regula la producció de LH per mitjà d'un mecanisme de retroalimentació negativa sobre l'hipotàlem i la hipòfisi.
- Els receptors de l'hormona estimulant del fol·licle, **FSH**, també estan situats a les cèl·lules de Sertoli. Allà estimula la producció de nombrosos factors que regulen l'espermatogènesi com, per exemple, la inhibina que juntament amb la testosterona regulen la funció de l'eix hipotalàmic-hipofisari mitjançant un *feed-back* negatiu. Les cèl·lules de Sertoli també produeixen la proteïna d'unió als andrògens (ABP) que s'uneix a la testosterona lliure, la segresta i l'acumula al citoplasma de les mateixes cèl·lules de Sertoli a l'espera del moment de ser alliberada, o bé la transporta cap a l'epidídim.

Així doncs, la regulació hormonal de l'espermatogènesi per part de les hormones LH, FSH, i testosterona té lloc mitjançant accions indirectes sobre el component somàtic del túbul (cèl·lules de

Leydig i cèl·lules de Sertoli) degut a que les cèl·lules germinals no expressen els receptors hormonals (Sofikitis et al., 2008).



**FIGURA 5. Esquema de la regulació hormonal de l'espermatoïgenesis.** Modificat de: l'atlas *Basic Histology*, Mc Graw Hill. FSH: Hormona estimulant del Fol·licle, LH: Hormona luteïnitzant, ABP: Proteïna d'unió als andrògens, T: Testosterona.

Tot i que la importància de les hormones testosterona i FSH a l'inici de l'espermatoïgenesis és indiscutible, es qüestiona el paper relatiu d'ambdues hormones en el manteniment del procés espermatoïgènic a llarg de la vida adulta.

Durant els últims quatre dies de la gestació, en la rata, els nivells hormonals de FSH es dupliquen, als cinc dies postpart ja s'han quadruplicat i continuen incrementant fins a establir-se en l'individu adult. Els nivells de testosterona també s'incrementen en els últims dies de gestació i durant l'etapa postpart fins al vintè dia. Aleshores, es van reduint fins a l'inici de l'espermatoïgenesis moment en que tornen a incrementar-se. Els nivells intratesticulars de testosterona són força més alts respecte als plasmàtics, degut a la proximitat de les cèl·lules de Leydig, que en sintetitzen (McLachlan, 2000). La concentració intratesticular de testosterona és força més gran que la que es necessitaria per saturar els seus receptors. És més, per tal d'assegurar una producció quantitativa i qualitativa normal d'espermatoïdies, a la rata, seria suficient al voltant del 20% de la concentració habitual intratesticular de testosterona. Si experimentalment es redueix aquesta per sota del 20%, l'espermatoïgenesis s'atura a uns nivells de testosterona majors que els plasmàtics i prou alts encara per mantenir els seus efectes en qualsevol altre part del cos (Cooper et al., 1988; McLachlan, 2000).

No se sap, encara, perquè es produeix en concentracions tan altes. Tanmateix, no tan sols és important la concentració total de testosterona sinó que és igualment important l'activitat del seu receptor. Alteracions en la concentració de testosterona total i lliure degut, d'una banda, a una disminució en la producció per part de les cèl·lules de Leydig o, per altra banda, a un augment en la proteïna d'unió als andrògens (ABP, que segresta la testosterona lliure) o bé alteracions en l'activitat del receptor d'andrògens (AR) per tòxics (com pot ser la Flutamida) comporta l'arrest de l'espermatogènesi en la fase d'espermatòcits paquitens i, per tant, l'esterilitat de l'individu. Una de les conseqüències del descens en la concentració de testosterona és que les espermatides rodones no poden continuar amb l'espermioogènesi i, a més, perden l'adhesió que tenen a les cèl·lules de Sertoli. Així doncs, són alliberades al lumen del túbul seminífer i acaben per ser fagotitzades per les cèl·lules de Sertoli (Sofikitis et al., 2008).

Segons aquestes dades, els andrògens serien necessaris per tal d'acomplir la primera divisió meiótica com evidencien clarament estudis d'immunohistoquímica, on la immunotinció positiva pels AR en les cèl·lules de Sertoli concorda amb la maduració de les cèl·lules germinals en els túbuls (Regadera et al., 2001; Suarez-Quian et al., 1999).

En el període prepúber, l'hormona FSH afavoreix la proliferació de les cèl·lules de Sertoli. El nombre d'aquestes cèl·lules determinarà el nombre màxim de cèl·lules germinals que poden sustentar i, en últim terme, la fertilitat de l'individu. La importància de l'hormona FSH a l'inici de l'espermatogènesi durant la pubertat és clara, es necessita la seva presència per tal de que els espermatogonis primitius comencin a dividir-se per regenerar-se i per produir els espermatòcits. A més, sinèrgicament amb la testosterona, vetlla per la viabilitat germinal (McLachlan et al., 2002; Russell et al., 1998). Quan s'elimina quirúrgicament la glàndula pituïtària (procés anomenat hipofisectomia) i per tant també s'eliminen les hormones gonadotropines (LH i FSH), es produeix una davallada quantitativa a tots els tipus cel·lulars de la línia germinal. Quan es tracta d'una hipofisectomia de llarga durada, les espermatides rodones són les cèl·lules germinals més avançades que s'hi troben, encara que els seus predecessors són presents en un nombre escàs. Els túbuls seminífers també presenten una mida més petita, igual que el lumen que pot arribar a desaparèixer. Les nombroses degeneracions germinals indiquen que tot i que l'espermatogènesi continua existeixen punts concrets on s'interromp (Clermont and Morgentaler, 1955).

Si s'administren les hormones gonadotropines en el moment de fer la hipofisectomia, l'espermatogènesi continua desenvolupant-se amb normalitat. Si ja s'ha produït la regressió de l'epiteli, en restablir els nivells de LH i FSH no s'aconsegueix restablir plenament el nombre de cèl·lules germinals (Boccabella et al., 1964). A més, ratolins *knockout* pel receptor de l'hormona FSH també mostren defectes en l'espermatogènesi tot i que es produeixen espermatozoides en baix

nombre i qualitat (Krishnamurthy et al., 2000). A més, la mida del testicle és considerablement menor en comparació amb la soca salvatge, que resultaria ser degut a un descens en el nombre de cèl·lules de Sertoli i, per tant, a una reducció en la seva capacitat de sustentar un nombre determinat de cèl·lules germinals (McLachlan, 2000). D'altra banda, s'han realitzat experiments amb ratolins congenitament deficients en l'hormona alliberadora de gonadotropines, GnRH (=hypogonadal mouse) i per tant sense les hormones LH i FSH que puguin estimular l'inici de l'espermatogènesi. Quan aquests ratolins són tractats amb andrògens desenvolupen una espermatogènesi normal, subratllant-se d'aquesta manera la necessitat de la testosterona a totes les fases del procés espermatogènic (Singh et al., 1995).

Així doncs, mentre que l'hormona FSH no és essencialment necessària per l'inici i la correcta progressió del procés espermatogènic, sí que es necessita per garantir la producció d'un nombre normal d'espermatozoides. Tal com es pot comprovar amb l'anàlisi de l'ejaculat d'homes que presenten mutacions espontànies en el receptor de l'hormona FSH (McLachlan, 2000). Aquests homes són oligospèrmics però fèrtils. Per tant, l'inici i el manteniment de l'espermatogènesi depèn del balanç entre l'eix hipotàlem- pituïtària- testicle.

Però, els andrògens directament no regulen la transcripció dels gens que s'expressen a les cèl·lules germinals i que són necessaris per la proliferació, la diferenciació, la fase meiòtica de l'espermatogènesi i/o l'espermiogènesi. S'assumeix, doncs, que les accions de la testosterona i dels seus derivats sobre les cèl·lules germinals estan mediatas per les cèl·lules somàtiques del testicle. Clarament va poder-se comprovar mitjançant experiments on es transplantaven espermatogonis provinents dels testicles de ratolins *Tfm* (amb la síndrome de feminització testicular) als testicles de ratolins azoospèrmics. Els ratolins *Tfm* es caracteritzen per l'absència, en el testicle, de receptors d'andrògens. En canvi, la segona soca d'animals, tot i ser estèrils, sí que presenten el receptor d'andrògens funcional. Llavors, els espermatogonis *Tfm*, en el testicle de l'animal azoospèrmic, van ser capaços de repoblar l'epiteli seminífer, i van completar una espermatogènesi qualitativament normal (Johnston et al., 2001). Donada l'estreta relació que mantenen les cèl·lules de Sertoli i les germinals, es pot assumir que són les primeres les encarregades de mediar els efectes dels andrògens sobre el procés espermatogènic.

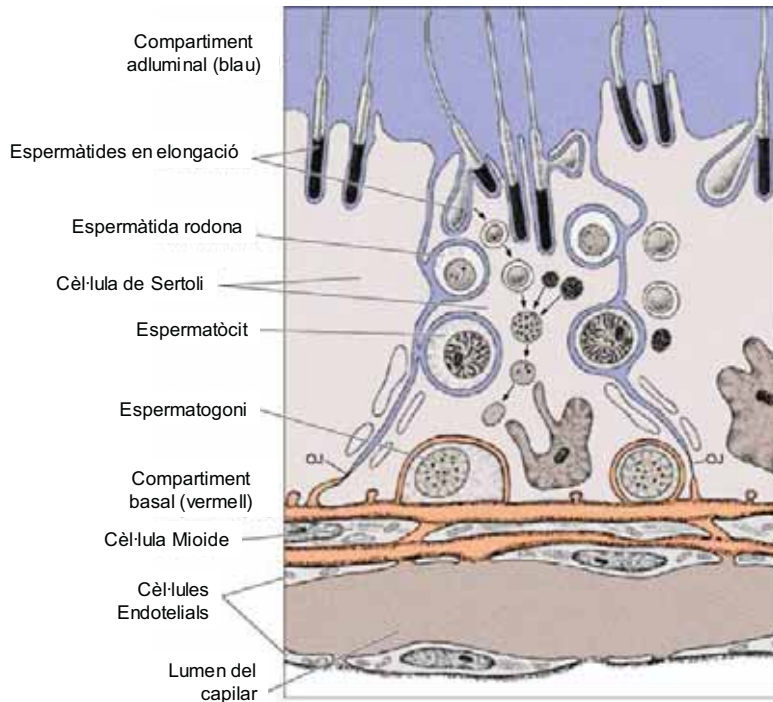
## 1.5.- Importància de les cèl·lules de Sertoli a l'espermatogènesi.

Les cèl·lules de Sertoli i les germinals mantenen una forta i estreta relació durant els processos de desenvolupament testicular i durant l'espermatogènesi que queda ben palesa quan

s'aïllen i es cultiven. Les cèl·lules de Sertoli en un cultiu primari viuen sense problemes durant, aproximadament, una setmana mentre que les germinals un cop aïllades moren. S'evidencia, d'aquesta senzilla manera, la necessitat de la coexistència d'ambdós tipus cel·lulars per tal de formar els espermatozoides. D'altra banda, el nombre de cèl·lules de Sertoli determinarà finalment la quantitat de cèl·lules germinals que produirà el testicle, ja que cada cèl·lula de Sertoli té la capacitat de sustentar el desenvolupament d'un nombre màxim de cèl·lules germinals (Petersen and Söder, 2006). Així, una reducció en el nombre de les cèl·lules de Sertoli, per acció de tòxics per exemple, comporta una reducció en la mida del testicle i un descens en el nombre d'espermatozoides produïts que podria conduir a la esterilitat de l'individu.

Durant l'etapa fetal les cèl·lules de Sertoli tenen un paper essencial en el desenvolupament estructural del testicle. En començar a formar-se els testicles embrionaris, aquestes segresten als precursors de les cèl·lules germinals (gonòcits) i els aturen l'entrada a la meiosi. Un cop que s'han format els testicles, les cèl·lules de Sertoli immadures proliferen ràpidament durant l'última part de la vida fetal i els primers mesos després del naixement. La proliferació està controlada per les hormones gonadotrofines (FSH) i per factors de creixement. A la pubertat, les cèl·lules de Sertoli canvien morfològica i funcionalment marcant el pas cap a l'estat adult. D'una banda perden la capacitat proliferativa, el nucli es fa més gran i multilobulat i el nuclèol també es fa més evident. El volum del citoplasma augmenta i perden la morfologia columnar, a la rata ocupen unes 90 micres d'alçada des de la base del túbul fins al lumen. En aquest moment són capaces de formar unions molt fortes, conegudes com a *tight junctions* o *gap junctions*, entre elles i amb les cèl·lules germinals. Aquestes últimes comencen a diferenciar-se quedant englobades dintre i sotmeses a les condicions metabòliques d'aquest nou compartiment. La creació d'aquesta barrera física afavoreix la formació de la llum tubular. Així doncs, a partir de la pubertat, la principal funció de les cèl·lules de Sertoli serà el manteniment físic i metabòlic de les diferents fases de l'espermatogènesi (Sharpe et al., 1994) (Figura 6). Al llarg de la vida adulta la població de cèl·lules de Sertoli resta pràcticament estable.

Com s'observa a la Figura 6, les cèl·lules de Sertoli elaboren nombroses unions basolaterals amb les cèl·lules adjacents (blau) i amb la làmina basal (vermell). Aquestes unions tenen una doble funció; d'una banda ajuden a mantenir la integritat de l'epiteli i a facilitar la comunicació intercel·lular. De l'altre, compartimenten l'epiteli seminífer formant dos espais perfectament separats i diferenciats, que són necessaris per a la regulació de les diferents fases de l'espermatogènesi, el compartiment basal (vermell) i el compartiment adluminal (blau).



**FIGURA 6.** Esquema de les interconnexions que es donen entre les cèl·lules de Sertoli i les cèl·lules veïnes. En blau es representa les unions basolaterals i en taronja la lamina basal. Adaptat de: *l'atlas Basic Histology*, Mc Graw Hill.

En el compartiment basal es localitzen els espermatogonis i els espermatòcits primaris fins a la fase de leptotè de la meiosi. Aquestes cèl·lules tenen una bona accessibilitat a les substàncies (nutrients i/o factors de creixement) presents al sistema limfàtic i indirectament, als presents al sistema vascular. Al compartiment adluminal es troben els espermatòcits des de la fase de paquíè fins als diplotens, les espermàtides rodones i en elongació, i els espermatozoides.

Al conjunt de les unions establertes per les cèl·lules de Sertoli es coneix com a Barrera Hemato-Testicular (BHT). Tot i ser una barrera física, permet el tràfic de substàncies cap al compartiment adluminal a concentracions menors de les trobades a la sang o al sistema limfàtic. Així mateix, s'han trobat substàncies al lumen tubular que es presenten amb concentracions més elevades que al plasma, ja que són productes de secrecions fetes tant per les cèl·lules germinals com per les de Sertoli (Setchell and Main, 1975). En referència als tòxics, la presència de la BHT dificulta el seu pas cap al lumen i, d'aquesta manera, es protegeixen els espermatozoides de l'acció de les substàncies nocives. Igualment es protegeixen les cèl·lules germinals en divisió dels possibles atacs autoimmunes i de les infeccions (Millette and Bellve, 1977; Siu and Cheng, 2004). Així doncs, les cèl·lules de Sertoli creen un microambient aïllat a l'organisme on es desenvolupen les fases meiótiques de l'espermatogènesi i la posterior maduració postmeiótica per produir espermatozoides funcionals.

Degut a l'existència de la BHT, els elements essencials pel progrés de l'espermatogènesi no poden difondre des de la circulació sanguínia fins al lumen tubular, per aquest motiu moltes de les molècules han de ser sintetitzades *in situ* per les cèl·lules de Sertoli o pels altres tipus cel·lulars. Així doncs, les cèl·lules de Sertoli produeixen els estímuls bioquímics en forma de factors de creixement (per exemple: TGF $\alpha$  i  $\beta$ , IGF-I, FGF i EGF) i nutrients (lactat) específics i necessaris per a què les cèl·lules germinals sobrevisquin, contribuint a la formació d'un microambient únic al compartiment adluminal. El conjunt de proteïnes i de factors de proliferació i diferenciació produïts i secretats al medi per les cèl·lules de Sertoli són la base molecular per la interacció entre aquestes cèl·lules i les germinals (Griswold, 1988; Griswold, 1995; Griswold, 1998). A les taules següents es resumeixen els diferents tipus de glicoproteïnes secretades i les seves funcions.

**A)**

Tipus de glicoproteïnes	Funció
Transportadors	Transport d'ions i/o metabòlits ex: Transferrina
Proteases i inhibidors	Remodelament tissular durant l'espermatogènesi
Estructurals	Formació de la làmina basal amb les cèl·lules peritubulars
Reguladores	Factors de creixement o factors paracrins com nutrients o intermediaris metabòlics

**B)**

Nom	Símbol	Referència
<i>Interleukin-4</i>	IL-4	(Cooke et al., 1996)
<i>Stem Cell Factor</i>	SCF	(Allard et al., 1996)
<i>Fibroblast Growth Factor</i>	FGF	(Griswold, 1998)
<i>Insulin Growth Factor-I</i>	IGF-I	(Griswold, 1998)
<i>Epidermal Growth Factor</i>	EGF	(Griswold, 1998)
<i>Bone Morphogenetic Protein</i>	BMP	(Itman and Loveland, 2008)
<i>Desert Hedgehog</i>	Dhh	(Gnessi et al., 1997)
<i>Glial cell line-derived Neurotrophic Factor</i>	GDNF	(Meng et al., 2001)
<i>Platelet-derived Growth Factor</i>	PDGF	(Basciani et al., 2002)
<i>Transforming Growth Factor-beta</i>	TGF $\beta$	(Griswold, 1998)
Lactat	-	(Erkkila et al., 2002)

TAULA 1. A) Glicoproteïnes fabricades i secretades per les cèl·lules de Sertoli. B) Proteïnes que poden actuar com a factors paracrins.

Per acabar de garantir el correcte progrés de l'espermatogènesi, les cèl·lules de Sertoli també s'encarreguen de:



- Secretar el fluid luminal, és el medi aquós pel qual els espermatozoides són transportats a través dels conductes seminífers.
- Trencar les unions amb les espermatides i els espermatozoides per tal d'afavorir la sortida d'aquests cap al lumen.
- Fagocitar les cèl·lules germinals que durant el procés normal de l'espermatogènesi degeneren o són afectades per algun agent deleteri. Finalment, també fagociten l'excés de citoplasma (anomenat cos residual) de les espermatides.

La principal via de control sobre l'espermatogènesi està regulada per una complexa interconnexió entre senyals hormonals i paracrins. Els primers provenen de l'actuació de les hormones FSH i testosterona sobre els receptors presents a la membrana de les cèl·lules de Sertoli (Suarez-Quian et al., 1999). Els segons són resultat de l'activitat metabòlica de les cèl·lules de Sertoli (lactat i factors de creixement). Però, es desconeix el mecanisme pel qual aquests influeixen a les cèl·lules germinals. Per aquestes raons, qualsevol alteració que provoqui anomalies en el conjunt de funcions que realitzen les cèl·lules de Sertoli també comporta alteracions o fins i tot aturades en la progressió de l'espermatogènesi, pèrdua de cèl·lules germinals i, en últim terme, esterilitat.

## 1.6.- Metabolisme energètic de les cèl·lules testiculars.

Per a portar a terme el procés espermatogènic, les nombroses cèl·lules germinals que hi progressen necessiten un elevat i eficient aport energètic. Com ja s'ha esmentat, el testicle es troba compartimentat per complexos d'unió gap formats per les cèl·lules de Sertoli. Així doncs, aquelles cèl·lules germinals que es localitzen dins la Barrera Hematotesticular (espermatoïts, les espermatides i els espermatozoides) queden sotmeses a les condicions metabòliques d'aquest compartiment i, per tant, l'oxigen únicament arriba al lumen per difusió. En canvi, els espermatogonis que es localitzen fora, al compartiment basal, prop dels capil·lars sanguinis capten l'oxigen del torrent sanguini. Degut a la gran distància de difusió i a l'alta taxa de consum d'oxigen per part de les cèl·lules proliferants, les pressions parcials d'oxigen ( $pO_2$ ) al lumen tubular són considerablement baixes (2 mmHg) essent la menor concentració d'oxigen de tot el cos (Wenger and Katschinski, 2005).

Les **cèl·lules de Sertoli** oxiden la glucosa sanguínia produint una gran quantitat de lactat (Mita and Hall, 1982; Robinson and Fritz, 1981), que és transportat en elevades concentracions cap a les cèl·lules germinals en diferenciació a través dels transportadors específics de monocarboxilases (MCT); en concret es dirigeix cap als espermatoïts i a les espermatides (Jutte et al., 1981). La

cooperació metabòlica entre les cèl·lules de Sertoli i les germinals pot quedar afectada per l'exposició a tòxics com la Flutamida (Goddard et al., 2003), que redueix la producció i el transport del lactat cap a les cèl·lules germinals meiótiques i postmeiótiques comportant la mort d'aquestes. Tanmateix, la producció de lactat s'incrementa en les cèl·lules de Sertoli en cultiu primari quan són sotmeses als esteroides sintètics (que *in vivo* interfereixen en la fertilitat masculina) (Monsees et al., 2000). Per aquestes raons, la presència de lactat podria considerar-se com un factor de supervivència ja que inhibeix l'apoptosi de les cèl·lules germinals (Erkkila et al., 2002) i també estimula la síntesi de RNA i de proteïnes a les espermàtides (Jutte et al., 1981; Nakamura et al., 1981). La seva producció està regulada per hormones, en concret per l'hormona estimulant del Fol·licle (FSH) (Jutte et al., 1983).

Els **espermatozois** estant localitzats al compartiment basal utilitzen directament la glucosa procedent de la sang com a font energètica, que serà metabolitzada seguint la glucòlisi i el cicle de Krebs. Però els espermatozois i les espermàtides, en estar englobats dins la Barrera Hematotesticular, fan servir lactat i piruvat per mantenir les seves concentracions d'ATP (Jutte et al., 1981; Mita and Hall, 1982; Nakamura et al., 1984a; Nakamura et al., 1984b). D'aquesta manera, la principal font d'energia canvia durant els diferents estadis de l'espermatozois de glucosa a lactat via piruvat. Aquesta plasticitat metabòlica comporta que l'espermatozois sigui un procés altament sensible als agents que interfereixin en el metabolisme energètic i en el control respiratori (Bajpai et al., 1998; Nakamura et al., 1984b).

Els **espermatozois** en cultiu primari poden utilitzar com a font energètica el piruvat, el lactat i en últim terme la glucosa. La interconversió entre el piruvat i el lactat depèn, bàsicament, de la concentració del primer metabolit. Si aquesta és inferior a 1 mM, el piruvat serà reduït cap a lactat a gran velocitat, però si s'incrementa per sobre de 1mM, la reducció de piruvat a lactat i l'oxidació en el cicle de Krebs es donen a la mateixa velocitat. Així doncs, el metabolisme dels espermatozois no depèn únicament de la cadena respiratòria, característica summament avantatjosa a l'hora de garantir l'aport energètic pel progrés de l'espermatozois (Jutte et al., 1981; Nakamura et al., 1984a). Les **espermàtides rodones**, en ser un tipus cel·lular més diferenciat, ja han perdut la capacitat de tria entre la glucòlisi i el cicle de Krebs. És a dir, el seu metabolisme depèn exclusivament del lactat i de la fosforilació oxidativa. Si es comparen les activitats dels enzims glucolítics en els dos tipus cel·lulars, resulten ser molt menors en les espermàtides. Així mateix, quan es cultiven les espermàtides en un medi ric en glucosa, l'ATP cau i augmenta la Fructosa-1,6-P<sub>2</sub>. En utilitzar inhibidors de la cadena respiratòria les cèl·lules es moren, evidenciant-se la dependència que tenen les espermàtides rodones d'aquesta via en la producció i el manteniment de l'ATP. A més, aquest efecte pot revertir afegint piruvat o lactat en el medi de cultiu, demostrant-se que la glucosa no és el substrat metabòlic d'elecció

d'aquest tipus cel·lular (Bajpai et al., 1998; Jutte et al., 1981; Mita and Hall, 1982; Nakamura et al., 1982; Nakamura et al., 1984b; Nakamura et al., 1986).

Nakamura i els seus col·laboradors van demostrar que els nivells intracel·lulars d'ATP a les espermatides aïllades i en cultiu primari es podrien mantenir a partir d'unes concentracions menors de lactat exogen respecte les fisiològiques. És a dir, que les espermatides podrien ser capaces de mantenir el seu metabolisme a partir del lactat present en el fluid tubular o sanguini, a part del que prové de les cèl·lules de Sertoli. Llavors, perquè són necessàries les concentracions de lactat elevades al lumen tubular? *In vivo*, l'enzim lactat deshidrogenasa afavoreix la ràpida conversió de piruvat a lactat a expenses de reduir la concentració de NADH (que seria major si es fes el cicle de Krebs). Per a mantenir la producció d'ATP a les cèl·lules germinals en cultiu a partir del lactat/piruvat endogen i del cicle de Krebs seria indispensable partir d'una gran quantitat de lactat exogen. *In vivo*, les cèl·lules de Sertoli s'encarreguen de proporcionar a les cèl·lules germinals el microambient ric en lactat que necessiten (Grootegoed et al., 1984).

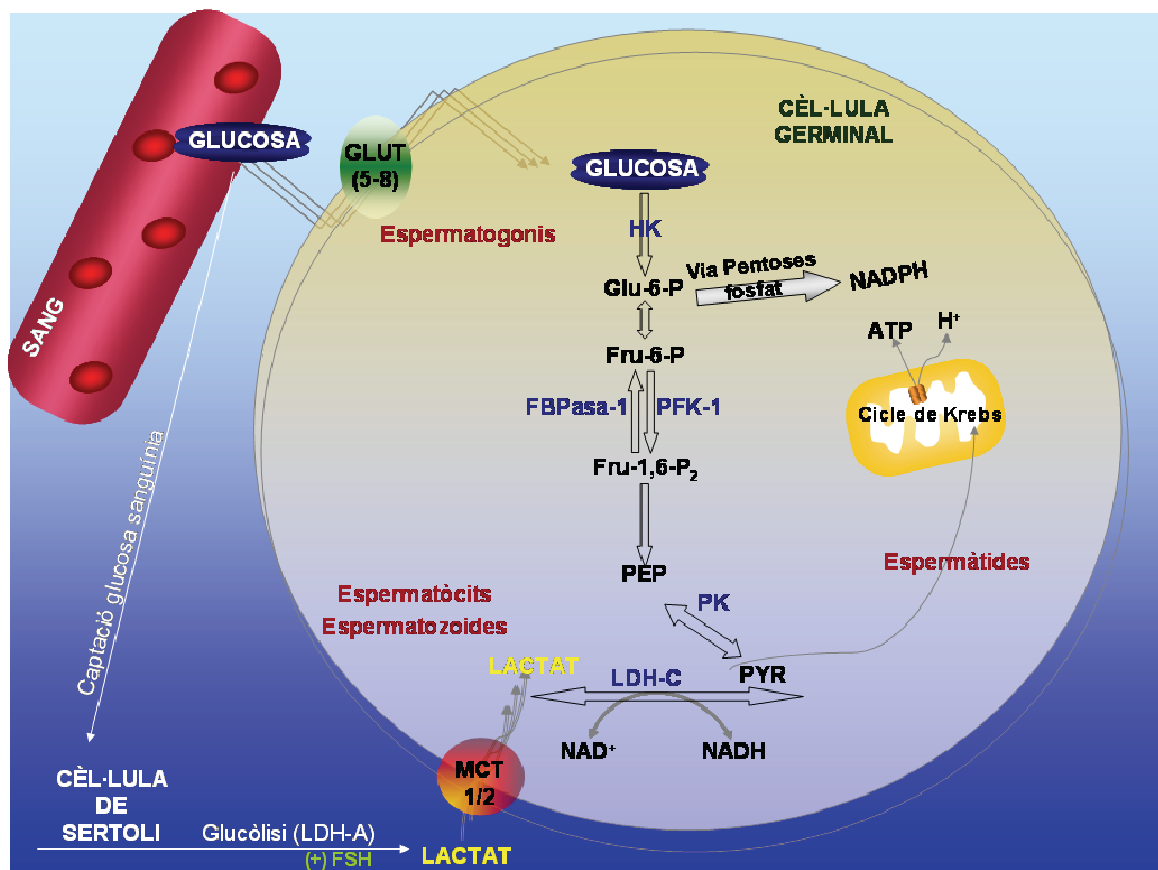
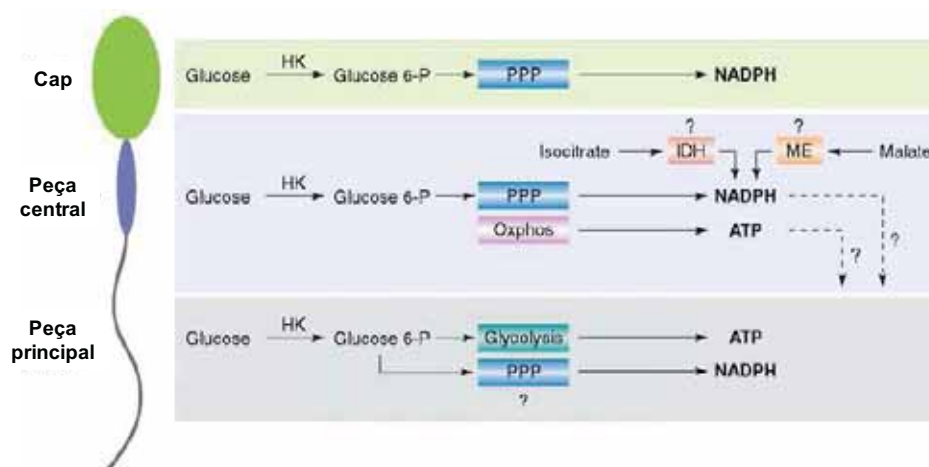


FIGURA 7. Esquema del metabolisme energètic a les cèl·lules germinals. Els espermatogonies utilitzen la glucosa procedent de la sang, els espermatocites fan servir el lactat procedent de les cèl·lules de Sertoli. Contràriament, les espermatides obtenen l'energia gràcies al cicle de Krebs. Els Espermatozoides poden utilitzar tant glucosa com fructosa.

Igual que succeeix amb la glucòlisi, els enzims que participen a la via de les pentoses fosfat presenten una major activitat als espermatòcits que no pas a les espermatides i, a més, també es veu reduïda als espermatozoides. Aquesta via és necessària per la síntesi de nucleòtids i de poder reductor, a més genera substrats i coenzims importants com són el NADPH i la ribosa-5-fosfat, (Grootegoed et al., 1986). Pel que fa al cicle de Krebs, de totes les cèl·lules germinals són les espermatides les que presenten la major activitat enzimàtica.

Al final de l'espermatogènesi, els **espermatozoides** tornen a tenir una gran capacitat glucolítica, i són capaços d'oxidar lactat, glucosa i fructosa (Bajpai et al., 1998). Però, tenint en compte que el fluid dels túbuls seminífers està enriquit en lactat, aquest seria el metabòlit usat preferiblement per part dels espermatozoides.

Els espermatozoides són cèl·lules altament polaritzades a nivell morfològic i funcional. Degut a que tenen poc citoplasma, gairabé no hi ha translocació de metabòlits intermediaris o substrats entre les seves regions. A més, són cèl·lules inactives transcripcionalment, per tant, tampoc hi ha síntesi de proteïnes *de novo* en resposta a estímuls o canvis ambientals. Conseqüentment, hi ha una compartimentació de les vies metabòliques i les de senyalització (Eddy et al., 2003; Travis et al., 2001). En referència a la polarització funcional, el cap conté el material genètic patern i s'encarrega d'interaccionar amb la matriu extracel·lular i la membrana plasmàtica de l'òvul. Per la seva banda, el flagel s'encarrega de proporcionar la motilitat a la cèl·lula. Amb la polarització estructural i funcional i la subseqüent compartimentació de les vies metabòliques s'aconsegueix que aquestes es localitzin en aquelles regions on són més necessàries (Figura 8).



**FIGURA 8. Compartimentació del metabolisme de la glucosa en l'espermatozoide.** En presència de glucosa, l'ATP és generat per la glucòlisi a la peça principal del flagel i a través de la fosforilació oxidativa (Oxphos) a la peça central. El NADPH és generat per la via de les pentoses fosfat (PPP) al cap i a la peça central de l'espermatozoide encara que es podria donar un pas cap a la peça principal. En absència de glucosa, l'ATP generat amb la fosforilació oxidativa pot ser transportat cap a la peça principal. El NADPH que es produeix a la peça central també pot originar-se a partir de Isocitrat i de Malat. Adaptat d'Urner and Sakkas, 2003.

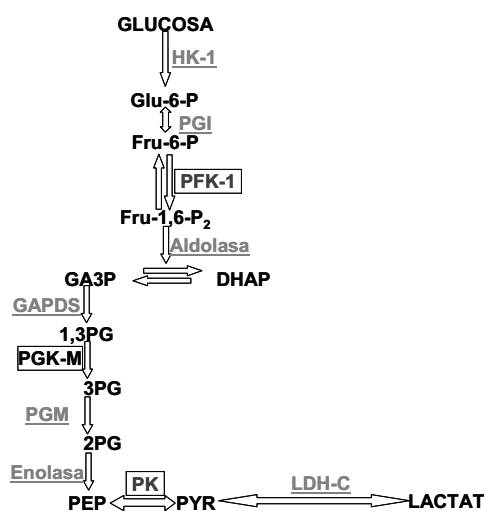
Així doncs, la respiració oxidativa es dona a la peça central de l'espermatozoide, ja que els mitocondris només es localitzen en aquesta àrea, mentre que la glucòlisi té lloc a la peça principal del flagel on es localitza el citoesquelet (*fibrous sheath*, FS). L'ATP que es genera en la peça principal és pel consum propi del citoesquelet en moure l'espermatozoide (Travis et al., 2001). La presència d'una alta compartimentació en el metabolisme de la glucosa, amb enzims de la via localitzats específicament a la peça central i a la peça principal, indica que tant la respiració com la glucòlisi són necessàries. Si es compara amb la resta de cèl·lules germinals, els espermatozoides tenen major activitat glucolítica, essent semblant a la trobada al múscul esquelètic, i tenen menor activitat del cicle de Krebs. Diversos grups han descrit l'existència d'enzims glucolítics associats al FS, com per exemple els enzims gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa-s (GAPDHs) (Miki et al., 2004a) i hexocinasa-1 (HK1-sc) (Mori et al., 1998; Travis et al., 1998) així com algunes proteïnes cinases reguladores (Carrera et al., 1994).

En els espermatozoides d'espècies tant distants com el ratolí i els humans entre d'altres, la glucosa és necessària per a produir la hiperomotilitat que requereixen per arribar a fertilitzar l'òvul (Hoshi et al., 1991; Mujica et al., 1991). L'absència d'aquesta hiperomotilitat, tant en els ratolins com als humans, comporta una fallida en l'entrada a la zona pel·lúcida dels espermatozoides i, com a conseqüència, ausència de fertilització (Urner and Sakkas, 1996a; Urner and Sakkas, 1996b). La glucosa i no el lactat ni el piruvat, també es necessita per a que es produeixin fenòmens de fosforilació de proteïnes tirosina-cinasa durant la capacitació i per a què augmentin els nivells d'ATP com es demostra en cultivar els espermatozoides amb 2-deoxiglucosa (2-DG, anàleg de la glucosa no metabolitzable) ja que s'inhibeixen les fosforilacions i cau també l'ATP. La caiguda de la concentració d'ATP és deguda a dos factors, en primer lloc la 2-DG consumeix ATP durant la seva fosforilació a 2-DG-6-fosfat i la inhibició de les fosforilacions s'explicaria perquè la 2-DG segresta fosfats inorgànics limitant la quantitat que queda disponible per tal de refosforilar l'ADP o l'AMP. Com a conseqüència els espermatozoides perden la motilitat en poques hores (Travis et al., 2001; Williams and Ford, 2001). A més, quan els espermatozoides són cultivats amb desacobladors de la cadena respiratòria, que inhibeixen la producció d'ATP però que permeten la respiració, no s'aprecien diferències en els patrons de fosforilacions de les proteïnes tirosina-cinasa, i la funcionalitat i mobilitat dels espermatozoides és l'adequada. Si pel contrari, s'incuben amb inhibidors de la cadena respiratòria, perden la motilitat degut a un *feed-back* negatiu sobre la glucòlisi en augmentar la concentració de lactat (Travis et al., 2001; Williams and Ford, 2001). D'aquesta manera es pot dir que la glucosa és necessària per mantenir la concentració òptima d'ATP així com per sostenir la motilitat òptima dels espermatozoides.

A la literatura, però, es descriu que els espermatozoides dels gossos conserven la motilitat en medis sense sucres. En els espermatozoides d'aquest model animal s'ha trobat evidències de la presència de glucogen i, a més, són capaços de fer gluconeogènesi a partir de lactat, amb els enzims FBPasa-1 i Aldolasa-B funcionals però no l'enzim Glucosa-6-Pasa, indicant de què la glucosa de nova síntesi es queda dins la cèl·lula (Albarracin et al., 2004a; Albarracin et al., 2004b; Ballester et al., 2000; Palomo et al., 2003).

Tot i que la via de les pentoses fosfat té una activitat molt més reduïda als espermatozoides que a les altres cèl·lules germinals, pot incrementar-se quan els espermatozoides són sotmesos a un estrès oxidatiu fort, protegint-los dels possibles danys derivats (Williams and Ford, 2004). Tanmateix, el NADPH generat a la via pot modular les fosforilacions de les proteïnes tirosina-cinases en els espermatozoides dels humans i dels ratolins, indicant que la via de les pentoses fosfat estaria involucrada en els mecanismes que controlen la fosforilació d'aquestes proteïnes durant el conjunt de modificacions moleculars que tenen lloc en la capacitació (Urner and Sakkas, 2003). Un cop que l'espermatozoide entra a l'òocit s'incrementa l'activitat de la via de les pentoses fosfat conjuntament amb la glucòlisi (Urner and Sakkas, 1999a; Urner and Sakkas, 1999b). L'activació metabòlica comença en la fertilització, quan es produeix la fusió dels gàmetes i/o quan l'espermatozoide es descondensa. Té lloc en un microambient on la concentració de glucosa és manté constant. Aquest fet implicaria que els canvis metabòlics produïts bé són deguts a algun factor que aporta l'espermatozoide per estimular el metabolisme de l'òocit. O bé, és l'òocit qui té a l'ooplasma el factor estimulador dels enzims glucolítics de l'espermatozoide durant la fusió (Urner and Sakkas, 1999a; Urner and Sakkas, 1999b).

La glucòlisi – la via metabòlica per la qual es metabolitza glucosa a piruvat/lactat produint-se quatre molècules d'ATP- és un procés altament conservat al llarg de l'evolució. Malgrat això, a quasi tots els passos de la via s'ha descrit l'existència d'isoenzims expressats de manera específica a les cèl·lules germinals (Eddy, 2002), tal com es mostra a la Figura 9.



**FIGURA 9. Esquema de la glucòlisi, des de glucosa fins a la formació de lactat.** En gris i subratllat s'han ressaltat aquells enzims específicament expressats a les cèl·lules germinals, en negre i recuadrats aquells enzims no específics de les cèl·lules germinals (Tanaka et al., 2004). HK: Hexocinasa, PGI: fosfoglucosa isomerasa, PFK-1; fosfofructo cinasa-1, GAPDS: gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa-s, PGK: fosfoglicerat cinasa, PGM: fosfoglicerat mutasa, PK: piruvat cinasa, LDH-C: lactat deshidrogenasa-c.

Un exemple d'enzims específics de la línia germinal es troba en els enzims gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa-s (GAPDH-S), lactat deshidrogenasa-c (LDH-C) i fosfoglicerat cinasa-2 (PGK-2). També s'ha descrit que alguns dels enzims de la via poden presentar característiques estructurals o funcionals en les cèl·lules germinals diferents de les que presenten a les cèl·lules somàtiques, com seria el cas dels enzims hexocinasa-1s (HK-1S), glucosafosfat isomerasa, aldolasa, fosfoglicerat mutasa i enolasa. A la Taula 2 es detalla una llista dels enzims glucolítics específics de les cèl·lules germinals i la seva localització cel·lular.

Enzim	Referència	Tipus cel·lular on s'expressa
HK-1s	(Mori et al., 1998)	Citoplasma i flagel de les espermatides en condensació Cap i part central del flagel dels espermatozoides (FS)
GAPDH-S	(Mezquita et al., 1998; Mori et al., 1992; Welch et al., 2006; Welch et al., 2000; Welch et al., 1992)	Cèl·lules germinals postmeiòtiques i espermatozoides (FS)
PGK2	(Kramer and Erickson, 1981; McCarrey et al., 1996)	Cèl·lules germinals premeiòtiques ( <i>pgk1</i> ) Cèl·lules germinals meiòtiques, postmeiòtiques i espermatozoides ( <i>pgk2</i> ) (FS)
LDH-C	(Goldberg, 1990)	A partir espermàtocit preleptotè fins a espermatozoide (FS)
GLUT 5-8	(Angulo et al., 1998; Schurmann et al., 2002)	(5) Flagel dels espermatozoides (transport fructosa) (8) Cap i acrosoma dels espermatozoides (transport glucosa)
MCT 1-2	(Boussouar et al., 2003)	(1) Diferents cèl·lules germinals (2) Espermatides en elongació
tPFK-2	(Sakata et al., 1991) (Manzano et al., 1999)	No s'ha descrit
PGI	(Buehr and McLaren, 1981)	Flagel dels espermatozoides (FS)
BspA	(Gillis and Tamblin, 1984)	Flagel dels espermatozoides (FS)
Triosafofat isomerasa	(Russell and Kim, 1996)	Flagel dels espermatozoides (FS)
PGM-M	(Broceno et al., 1995)	Flagel dels espermatozoides (FS)
ENO-S	(Edwards and Grootegoed, 1983)	Flagel dels espermatozoides (FS)
PDH- E1 $\alpha$	(Dahl et al., 1990)	???

**TAULA 2: Enzims glucolítics d'expressió específica en testicle de mamífers.** HK-1: Hexocinasa-1, GAPDH-S: gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa-s, PGK-2: fosfoglicerat cinasa-2, LDH-C: lactat deshidrogenasa-c., GLUT5-8: transportador de glucosa 5-8, MCT 1-2: transportador de monocarboxilases 1-2, tPFK-2; fosfofructo cinasa-2 (PFKFB4), PGI: fosfoglucosa isomerasa, PGM-M: fosfoglicerat mutasa muscular, BspA: aldolasa d'espermatozoides bovins, ENO-S: Enolasa-s, PDH-E1 $\alpha$ : piruvat deshidrogenasa subunitat E1 $\alpha$ .

L'existència d'enzims glucolítics d'expressió específica en les cèl·lules germinals així com els canvis en els substrats a partir dels que obtenir l'ATP durant les successives fases de l'espermatogènesi suggereix que la via glucolítica juga un *role* important en la producció de l'energia necessària en la respiració, en la hiperactivació de la motilitat i en la fertilització. A més, els enzims glucolítics es caracteritzarien per tenir una gran plasticitat en la seva expressió i per estar sota una fina regulació enzimàtica durant tot el procés de formació i maduració dels espermatozoides. Per aquestes raons, qualsevol alteració en la via glucolítica que provoqués fallides en l'obtenció de l'energia necessària per mantenir la funcionalitat de l'espermatozoide es traduiria, finalment, en problemes en la fertilitat.

### 1.7.- L'enzim 6-fosfofructocinasa-1.

L'enzim 6-fosfofructocinasa-1 (PFK-1) catalitza un pas limitant de la via glucolítica, la conversió de la Fructosa 6-P a Fructosa 1,6-P<sub>2</sub>. El producte resultant de la reacció enzimàtica activa la HK i la PK que al seu torn catalitzen dos passos també importants en el control del flux glucolític, la conversió de la Glucosa a Glucosa 6-P i la del PEP a piruvat, respectivament. L'enzim PFK-1 és un enzim multimodulat que presenta regulació al·lostèrica per efectors i metabòlits de la via (Sols, 1981). Dos substrats de la reacció, l'ATP i la Fru-6-P i un seguit d'efectors negatius (citrat, Glicerol-3-P) i positius (AMP, Fru-2,6-P<sub>2</sub>), que reforcen l'acció dels substrats, són els encarregats de regular l'activitat de l'enzim PFK-1. L'ATP actua com a efector al·lostèric negatiu, mentre que la Fru-6-P allibera l'enzim d'aquesta inhibició.

El grup del professor Hue (1986), va estudiar la presència de l'enzim PFK-1 als espermatozoides bovins i va determinar les seves propietats cinètiques, resumides a la següent taula (Taula 3), comparant-ho amb la isoforma present al múscul (Philippe et al., 1986).

PFK-1	Testicle	Múscul
AMP	Poc sensible (↑)	↑
Gluc-1,6-P <sub>2</sub>	Poc sensible (↑↑)	↑
Fru-2,6-P <sub>2</sub>	↑	↑

FBPasa-1	Testicle	Múscul
AMP	↓*	↓
Fru-2,6-P <sub>2</sub>	↓*	↓

**TAULA 3:** Característiques cinètiques a testicle dels enzims 6-fosfofructocinasa-1 (PFK-1) i fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1). ↑, ↓: Activació – inhibició, respectivament. \* Es dona un efecte sinèrgic de l'AMP i la Fru-2,6-P<sub>2</sub> sobre l'activitat FBPasa-1 de la isoforma de testicle, aconseguint-se una inhibició propera al 90%.



Altres grups (Yanez et al., 2007) també han descrit la presència (a nivell d'mRNA i de proteïna) de la isoforma muscular de la PFK-1 i de la isoforma hepàtica de la FBPasa-1 en el testicle de rata, concretament als espermatòcits en fase de paquitè i a les espermàtides rodones. La PFK-1 muscular també s'ha localitzat a les cèl·lules de Sertoli mentre que la isoforma hepàtica de la FBPasa-1 no. Com ja s'havia esmentat abans, les cèl·lules de Sertoli són altament glucolítiques. Fabriquen lactat que serà utilitzat per les cèl·lules germinals per produir ATP i inhibir l'apoptosi. Llavors la presència de l'enzim PFK-1 actiu en aquest tipus cel·lular seria molt més necessària que no pas la FBPasa-1 per tal de direccionar i controlar la intensitat de la via glucolítica cap a la producció de lactat.

Aquestes dades, juntament amb la producció de glucosa-6-P i NADH a les espermàtides, indiquen que a les cèl·lules germinals postmeiòtiques la direcció de les vies glucolítiques – gluconeogèniques es regularia mitjançant el cicle de substrats a nivell de la PFK-1/ FBPasa-1. Aquest cicle és bàsic per al reemplenament dels dipòsits de NADPH per la via de les pentoses fosfat, la importància de la qual durant el desenvolupament dels espermatozoides i la seva posterior funció s'ha esmentat en l'apartat anterior. També subratlla la importància d'estudiar la implicació dels reguladors al·lostèrics de la PFK-1 i la FBPasa-1 en el control glucolític d'aquestes cèl·lules.

### 1.8.- Fructosa 2,6-bisfosfat.

La Fructosa 2,6-bisfosfat (Fru-2,6-P<sub>2</sub>) va ser descoberta a principis dels anys 80, en el transcurs d'un estudi sobre l'acció del glucagó en la gluconeogènesi hepàtica i es va comprovar que era l'activador al·lostèric més potent de l'enzim PFK-1 (Pilkis et al., 1981; Uyeda et al., 1981; Van Schaftingen and Hers, 1981; Van Schaftingen et al., 1980a; Van Schaftingen et al., 1980b; Van Schaftingen et al., 1981).

La Fru-2,6-P<sub>2</sub> presenta una doble activitat sobre l'enzim PFK-1, per una banda augmenta l'afinitat de la PFK-1 per la Fru-6-P i, per una altra, sinèrgicament amb l'AMP allibera l'enzim de la inhibició efectuada per l'ATP. Així mateix, també augmenta l'afinitat de la PFK-1 i de la Fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1, que catalitza el pas de Fru-1,6-P<sub>2</sub> a Fru-6-P) per l'AMP, que activa la PFK-1 i inhibeix la FBPasa-1 (Pilkis et al. 1981a; Pilkis et al.1981b; Van Schaftingen & Hers 1981; Van Schaftingen et al.1981). Així doncs, les variacions de la concentració d'aquest metabòlit regulen l'activitat de la PFK-1 en tots els teixits glucòlisi-dependents, i indirectament, regulen la intensitat i la direcció de la glucòlisi i la gluconeogènesi amb aquest doble efecte sobre la PFK-1 i la FBPasa-1. Aquest conjunt de propietats metabòliques de la Fructosa 2,6-P<sub>2</sub>, li confereixen un paper clau en el

control del pas de Fructosa-6-fosfat a Fructosa 1,6-bisfosfat. Des del seu descobriment en fetge de rata, s'ha localitzat en tots els teixits eucariòtics en què s'ha estudiat; però, fins el moment, no s'ha descrit en procariotes (Okar et al. 2001). Als espermatozoides bovins es va descriure la presència de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> a una concentració similar a la present en d'altres teixits (1-2 µM) (Philippe et al., 1986).

Donat l'important paper que té la PFK-1 en el control del flux glucolític, la Fru-2,6-P<sub>2</sub>, en ser el seu activador més importat, resulta ser una bona candidata per controlar la via quan la concentració d'ATP és alta. Per aquest motiu, en les cèl·lules altament proliferatives on la concentració fisiològica d'ATP és suficientment alta per poder inhibir la PFK-1, la Fru-2,6-P<sub>2</sub> podria ser la responsable de mantenir l'alta taxa glucolítica que presenten aquestes cèl·lules. Les evidències que apunten cap aquest paper de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> en la glucòlisi aeròbica de cèl·lules proliferants es basen en estudis de línies tumorals establertes i en l'estudi dels efectes sobre la glucòlisi que realitzen factors de creixement, agents inductors de tumors com els èsters de forbol i la transformació oncogènica.

Quan es compara la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> en línies cel·lulars establertes a partir de tumors amb els valors del teixit normal, en alguns casos és la mateixa, com per exemple en cèl·lules d'hepatoma de rata (HTC) (Loiseau et al. 1985) o cèl·lules de tumors ascítics d'Ehrlich (Bosca et al. 1985a), però en d'altres és clarament superior, com en cèl·lules HeLa (Mojena et al. 1985), cèl·lules HT29 d'adenocarcinoma de còlon (Denis et al. 1986), en cèl·lules de carcinoma de pulmó de Lewis (Miralpeix et al. 1990) o en cèl·lules de leucèmia linfàtica crònica (Colomer et al. 1987).

Així mateix, s'han realitzat estudis en què es determina el paper de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> en l'activació del flux glucolític de cèl·lules proliferants o tractades amb agents mitogènics; observant que l'estimulació de la producció de lactat realitzada pel sèrum i la insulina en fibroblasts humans correlaciona amb un augment en la concentració d'aquest metabòlit (Bruni et al. 1983; Farnararo et al. 1984). L'estimulació de la glucòlisi observada en fibroblasts embrionaris de pollastre en resposta a concentracions mitogèniques d'insulina i d'èsters de forbol també correlaciona amb un augment de la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> (Bosca et al. 1985c). Paral·lelament, la transformació de fibroblasts embrionaris de pollastre amb retrovirus que contenen els oncogens v-src o v-fps, també provoca una inducció dels nivells de Fru-2,6-P<sub>2</sub>, una estimulació del flux glucolític i de la proliferació cel·lular (Bosca et al. 1986), però aquest efecte té lloc per una via diferent a la dels èsters de forbol (Marchand et al. 1992). Igualment, Kole et al. Demostren que la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> en fibroblasts Rat-1 es triplica com a resultat de la transformació induïda per l'oncogen Ras (Kole et al. 1991).

En altres línies cel·lulars establertes s'han trobat resultats equivalents. Cèl·lules HT29 d'adenocarcinoma de còlon humà estimulades amb èsters de forbol o insulina presenten un augment en el consum de glucosa, dels nivells de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i de la producció de lactat (Denis-Pouxviel et al.

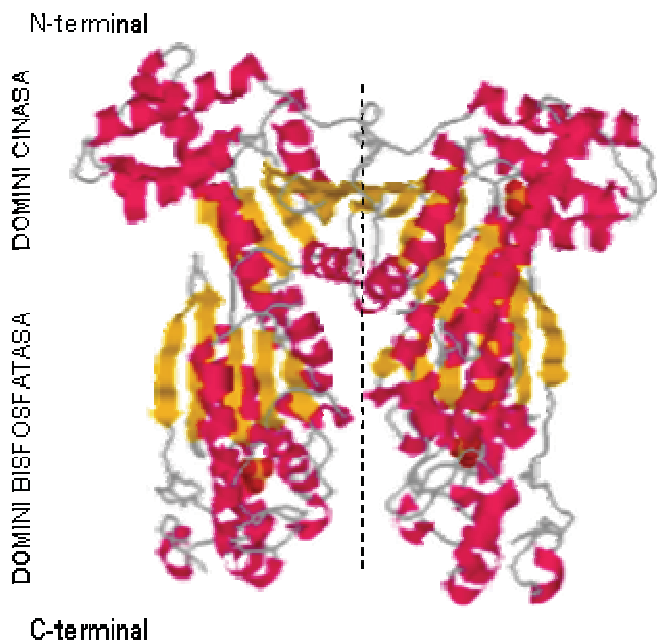
1990). El factor de creixement epidèrmic (EGF) incrementa els nivells de Fru-2,6-P<sub>2</sub> en cèl·lules A431 d'adenocarcinoma humà (Baulida et al. 1992). En fibroblasts swiss-3T3, l'estimulació de diferents vies mitogèniques (PKC, cAMP i insulina) produeixen un augment de la concentració intracel·lular de Fru-2,6-P<sub>2</sub> (Dalmau et al. 1994).

Tots aquests resultats posen de manifest una correlació entre els nivells de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i la taxa glucolítica en diferents condicions d'estimulació de la proliferació cel·lular i permeten apuntar la importància d'aquest metabòlit en la regulació de la glucòlisi i, més concretament, en el paper que pot jugar en el control de la glucòlisi en sistemes proliferants. De manera que la regulació dels nivells intracel·lulars de Fru-2,6-P<sub>2</sub> és un punt de connexió entre els senyals mitogènics i el metabolisme energètic de la cèl·lula.

### **1.9.- L'enzim 6-fosfofructocinasa-2 / fructosa-2,6-bisfosfatasa.**

El paper clau que té la Fru-2,6-P<sub>2</sub> en el control de la glucòlisi i gluconeogènesi va fer despertar l'interès en aquest metabòlit i en els enzims responsables de la seva síntesi i degradació. La concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> en la cèl·lula depèn de l'activitat enzimàtica d'una família d'enzims multifuncionals coneguts com a 6-fosfofructocinasa-2/fructosa 2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2). En encarregar-se tant de la síntesi com de la degradació de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> regulen, de retruc, el metabolisme de carbohidrats (Pilkis et al., 1995; Rider et al., 2004). El balanç entre l'activitat 6-fosfofructocinasa-2 (PFK-2), que sintetitza la Fru-2,6-P<sub>2</sub> a partir de Fru-6-P i ATP, i l'activitat fructosa-2,6-bisfosfatasa (FBPasa-2), que degrada la Fru-2,6-P<sub>2</sub> en Fru-6-P i fosfat inorgànic, és el que determinarà en darrer terme la concentració d'aquest metabòlit.

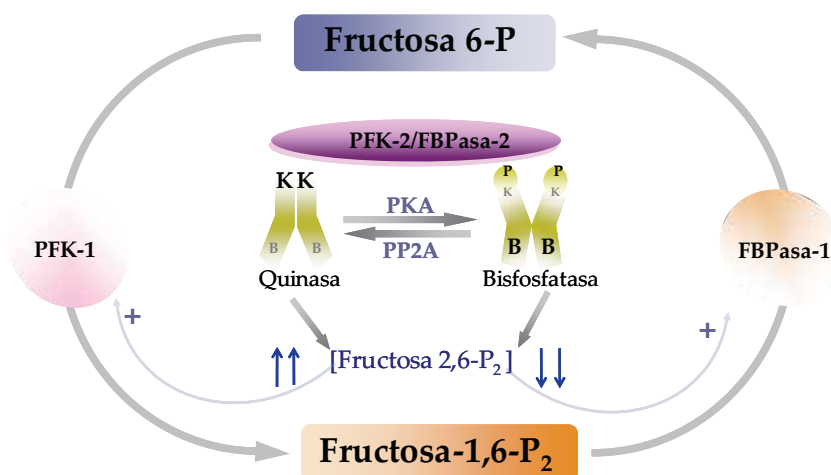
Les activitats PFK-2 i FBPasa-2 copurifiquen en una proteïna de 110 kDa formada per dues subunitats de 55 kDa cadascuna. Cada monòmer presenta les dues activitats en la mateixa cadena polipeptídica, comportant-se com un enzim homodímeric i bifuncional, que presenta el domini cinasa en l'extrem N-terminal de la proteïna i el bisfosfatasa en l'extrem C-terminal (El-Maghrabi et al. 1982; Pilkis et al. 1995; Okar et al. 2001). Com es mostra a la Figura 10, els dos monòmers interaccionen per múltiples contactes proteïna-proteïna entre els dominis cinasa de cadascun, els dominis bisfosfatasa tenen molt poques interaccions entre ells (Okar et al. 2001). L'única excepció es dona en els llevats on les activitats PFK-2 i FBPasa es localitzen en proteïnes diferents (Kretschmer & Fraenkel 1991; Kretschmer et al. 1987; Kretschmer et al. 1991).



**FIGURA 10. Estructura tridimensional del dímer PFK-2/FBPasa-2 de l'isoenzim de testicle.** (Hasemann et al.1996). El domini cinasa es localitza a l'extrem N-terminal, mentre que el domini bisfosfatasa ho fa a l'extrem C-terminal. Mitjançant una línia discontinua es representa la interfase entre els monòmers està representada per una línia discontinua.

El fet de què la Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> sigui un metabòlit clau en el control del metabolisme dels carbohidrats, fa que la regulació les dues activitats encarregades de sintetitzar-la i degradar-la hagin d'estar molt relacionades i compenetrades per ser capaces d'adaptar els nivells de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> a les necessitats que la cèl·lula o el teixit té en cada moment.

Sobre l'enzim bifuncional PFK-2/FBPasa convergeixen senyals metabòlics i hormonals, és a dir, és tracta d'una multimodulació de l'activitat enzimàtica (Figura 11).



**FIGURA 11. Activitat de la 6-fosfofructocinasa-2/fructosa 2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2) a fetge.** Quan l'activitat bisfosfatasa es elevada, la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> disminueix i per tant es facilita el pas de Fru-1,6-P<sub>2</sub> a Fru-6-P. Quan predomina l'activitat cinasa, la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> augmenta i s'activa al·lostèricament la PFK-1 i, conseqüentment, el flux glucolític.

Les propietats d'aquest enzim van ser descrites a fetge per primera vegada, i es va poder constatar que la regulació d'ambdues activitats estava molt relacionada. L'activitat PFK-2, en l'hepatocit, es troba inhibida per citrat, PEP i sn-glicerol-3-fosfat a concentracions fisiològiques d'aquests metabòlits en l'hepatòcit i és activada per la Fru-6-P. Pel contrari, l'activitat FBPasa-2 és estimulada per sn-glicerol-3-fosfat i nucleòsids trifosfats i està inhibida per la Fru-6-P (Bartrons et al. 1983; Rousseau & Hue 1993). Així mateix, aquest enzim es fosforila en la Ser-32 en resposta a glucagó per acció de la proteïna cinasa depenent d'AMP cíclic (PKA). Aquesta fosforilació a l'extrem N-terminal de la proteïna produeix un canvi conformacional en el dímer (Okar et al. 2001) que suposa una disminució de l'activitat cinasa i un augment de la bisfosfatasa (Stewart et al. 1986; Exton 1987). L'efecte contrari es dona amb la desfosforilació de l'enzim en resposta a insulina (Pilkis et al. 1988; Nishimura et al. 1994).

Tot i que la concentració de la Fru-2,6-P<sub>2</sub> depèn de l'activitat relativa de PFK-2/FBPasa-2 en tots els teixits, la importància que té aquest metabòlit en el control del metabolisme dels carbohidrats no és igual en tots ells. Així, mentre que la relació entre la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i la regulació del flux glucolític i gluconeogènic és clara en fetge, en teixits com el múscul esquelètic, el testicle o el cervell deixa de tenir un paper clau i passa a tenir un paper permissiu, mantenint la PFK-1 en estat actiu. Això és degut a què el seu paper està lligat a la importància de la PFK-1, de manera que en aquells teixits on la glucòlisi és la principal font d'energia, la funció d'aquest metabòlit està limitada a mantenir la via permanentment activa (Hue & Rider 1987; Hue et al. 1990; Pilkis 1988; Ventura et al. 1991).

Les diferents necessitats energètiques de cada teixit o tipus cel·lular dins d'un organisme i el grau de complexitat que suposa la regulació dels nivells de Fru-2,6-P<sub>2</sub> en cada teixit i condició fisiològica, expliquen l'existència de diferents isoenzims de la PFK-2/FBPasa capaços de respondre de forma eficient a les diferents demandes bioenergètiques en un moment donat. Els estudis realitzats comparant les propietats enzimàtiques de la PFK-2/FBPasa-2 de fetge amb les característiques dels enzims aïllats d'altres teixits com cor i múscul, van permetre obtenir evidències de l'existència de diferents isoenzims amb especificitat tissular (Rider et al. 1985; El-Maghrabi et al. 1986).

### **1.10.- Isoenzims de la PFK-2/FBPasa.**

Des de la descoberta de la isoforma de PFK-2/FBPasa de fetge de rata, s'han descrit més isoformes localitzades al múscul esquelètic (Darville et al. 1989), cor (Darville et al. 1991), cervell

(Ventura et al. 1992; Watanabe et al. 1994; Ventura et al. 1995), testicle (Sakata et al. 1991; Manzano et al. 1999), i una isoforma ubiqua que és present en tots els teixits estudiats (Manzano et al. 1998, Sakai et al. 1996) i a cèl·lules tumorals (Hamilton et al. 1997), així com també un isoenzim denominat *F-type* clonat a partir de cèl·lules FTO2B d'hepatoma de rata, molt semblant a les isoformes de fetge i múscul (Dupriez et al. 1993). També s'ha identificat un segon isoenzim a cor que únicament difereix en l'extrem C-terminal de la isoforma descrita anteriorment (Vidal et al. 1993). I una isoforma ubiqua clonada primerament a partir d'una llibreria de cDNA de cervell fetal i que és present en tots els teixits estudiats (Manzano et al., 1998). Aquesta isoforma també va ser clonada a partir de placenta i de cèl·lules tumorals T47D de càncer de mama (Hamilton et al., 1997; Sakai et al., 1996). Per últim, s'ha descrit una isoforma induïble descrita per Chesney et al. Que només difereix en l'extrem C-terminal amb l'isoenzim ubic (Chesney et al. 1999). Fins el moment s'han descrit vuit isoenzims de la PFK-2/FBPasa en mamífers generats per splicings alternatius (Okar et al. 2001).

Entre les PFK-2/FBPasa-2 descrites hi ha un alt grau de conservació en la seqüència aminoacídica dels centres catalítics de les activitats cinasa i bisfosfatasa; pel contrari, en els extrems N- i C-terminals de les proteïnes resideix la major divergència. Les seqüències més similars, codificades per gens diferents, són les de testicle i fetge, amb un 75% d'homologia, seguides de cor i fetge. L'isoenzim ubic presenta la major divergència respecte al de fetge. Malgrat la conservació del centre catalític, els diferents isoenzims presenten diferències en les seves activitats enzimàtiques i, per tant, en la seva relació cinasa:bisfosfatasa (Taula 4), així com diferències en la capacitat de ser fosforilades per les diferents proteïnes cinases que regulen la seva activitat. Les diferències en l'homologia així com les diferències en les activitats enzimàtiques segurament són degudes a les diferències existents en els extrems N- i C-terminal que confereixen canvis estructurals a la proteïna. A més, en aquestes regions és on es localitzen majoritàriament les dianes de fosforilació per a proteïnes cinases reguladores (Taula 4).

Gen	Locus cromosòmic	mRNA	Relació Cinasa:Bisfosfatasa	Isoenzims identificats	Fosforilacions
<i>Pfkfb1</i>	humà, X p11-21 rata, X q22-q31	L M F	2.5 (fetge de rata) 0.4 (múscul de rata)	L-PFK-2 (PFKFB1) (fetge) M-PFK-2 (mPFKFB1) (múscul) F-PFK-2 ( f-PFKFB1) (fetal)	PKA
<i>Pfkfb2</i>	humà, 1 q31 rata 13	H1, H2, H4 H3	1.8 (cor boví)	H-PFK-2 (PFKFB2)(cor)	PKA, PKC, PKB, AMPK
<i>Pfkfb3</i>	humà, 10 p14-p15 rata 17 q12.3	U I	710 (placenta humana) 3.1 (cervell boví)	uPFK-2 (PFKFB3)(cervell, placenta, ubic) iPFK-2 (i-PFKFB3)(induïble)	PKA, PKC, AMPK
<i>Pfkfb4</i>	humà, 3 p21-p22 rata 8 q32	T	0.9 (testicle humà) 4.9 (testicle rata)	tPFK-2 (PFKFB4) (testicle)	PKC

**TAULA 4: Gens de la família PFK-2, mRNA i proteïnes per les que codifiquen.** Relació de les seves activitats cinasa/ bisfosfatasa. Proteïnes cinases que els fosforilen. Adaptat de Rider et al., 2004.

El gen *Pfkfb1* codifica per les isoformes originalment identificades a fetge, múscul i la isoforma fetal. El gen *Pfkfb2* codifica per l'isoenzim identificat a cor i ronyó. El gen *Pfkfb3* codifica pels isoenzims de cervell, placenta i teixit adipós, actualment anomenat ubic, i per l'induïble. I per últim, el gen *Pfkfb4* que codifica per l'isoenzim de testicle (Taula 4). Tots quatre gens tenen una organització similar, que explica que cadascú codifiqui per un isoenzim, per diferents isoformes generades per splicing alternatiu, i per més mRNAs deguts a la presència de diversos promotors i d'exons 5'-no codificants.

Recentment, el nostre laboratori en col·laboració amb el grup de Bensaad, K. Va identificar una nova proteïna que es va anomenar TIGAR (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*). TIGAR presenta similituds amb la família proteica de la fosfoglicerat mutasa (PGM) i amb la família de la 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa. Dites similituds es limiten principalment a la regió catalítica, essent el domini bisfosfatasa dels isoenzims PFK-2 el que té la major homologia funcional (Bensaad et al., 2006). TIGAR és capaç de disminuir els nivells de Fru-2,6-P<sub>2</sub> cel·lulars i, per tant, bloquejar la via glucolítica, redirigint la glucosa cap a la via de les pentoses fosfats per tal de produir NADPH. Per aquestes raons, se'l podria considerar com el cinquè membre de la família de la PFK-2/FBP-2: seria la PFKFB 5 (Bartrons and Caro, 2007; Bensaad et al., 2006).

Tot i que cada isoenzim rep el nom del teixit on primerament es va identificar i purificar, s'ha demostrat que s'expressen en d'altres teixits així com també l'expressió de diferents isoenzims en una mateixa cèl·lula. Pel que fa al testicle, s'han trobat expressats els isoenzims codificats pels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* (Manzano et al., 1999; Riera, 2002).

### 1.11.- El gen *Pfkfb3*

El gen *Pfkfb3* es localitza al braç curt del cromosoma 10 humà, a la regió compresa entre les bandes p14-p15 (Manzano et al., 1998). Està format per 19 exons els quals per splicing alternatiu transcriuen com a mínim per a 6 mRNAs (Kessler and Eschrich, 2001; Navarro-Sabaté et al., 2001). S'han identificat tres proteïnes d'aquests sis mRNAs, la induïble (iPFK-2, iPFKFB3), que conté 16 exons, la ubiqüa (uPFK-2, PFKFB3) que conté 15 exons i es diferencia de la induïble per splicing alternatiu de l'exó 16, i la RB2K3 (k3-PFKFB3) que conté 17 exons i es diferencia de les anteriors per l'existència d'un exó extra (Chesney et al., 1999; Duran et al., 2008; Manzano et al., 1998). Les

proteïnes iPFK-2 i uPFK-2 tenen el mateix pes molecular (59 kDa), però la proteïna RB2K3, a causa de l'exó extra, és una mica més gran.

Hamilton i col·laboradors, van demostrar la presència del mRNA d'aquest gen en diferents línies cel·lulars de càncer de mama i la seva ràpida inducció mitjançant anàlegs de progesterona, suggerint que aquest gen podria estar involucrat en la progressió del càncer de pit (Hamilton et al., 1997). Paral·lelament, tant el mRNA del gen *Pfkfb3* com la seva proteïna es van trobar sobreexpressats en diferents línies cel·lulars de leucèmia i adenocarcinoma en comparació amb les cèl·lules normals (Atsumi et al., 2002; Chesney et al., 1999). Altres estudis realitzats al nostre laboratori identificaven la presència de l'mRNA d'aquest gen a línies cel·lulars de càncer com les HeLa (càncer de cèrvix), les HT 29 (d'adenocarcinoma de còlon) i a les T98G (glioblastoma) (Calvo et al., 2006; Navarro-Sabaté et al., 2001; Obach et al., 2004; Riera et al., 2002). Queda demostrada la importància de *Pfkfb3* en aquestes cèl·lules transformades. La confirmació de què el gen *Pfkfb3* està involucrat en la viabilitat i proliferació cel·lular es va obtenir gràcies a la silenciament del seu RNA (Calvo et al., 2006) i a la inhibició de PFK-2 mitjançant la utilització d'un inhibidor específic, N-bromoacetiletanolamina fosfat i els seus anàlegs (Hirata et al., 2000). Amb aquests experiments es va observar una disminució de la viabilitat cel·lular, un retard en la progressió del cicle cel·lular i una inhibició de la capacitat de creixement per ancoratge (és a dir, la pèrdua de la capacitat de formar focus en un cultiu semisòlid) i una disminució del creixement tumoral. Aquests resultats permeten postular que l'isoenzim codificat pel gen *Pfkfb3* és un dels responsables d'induir la glucòlisi en els sistemes proliferants tumorals.

Pel que fa als sistemes no tumorals, quan s'analitza l'expressió de la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) en diferents teixits de rata, es pot comprovar que s'expressa principalment en aquells teixits que tenen una major proliferació cel·lular: el testicle, el timus i la melsa, així com també a cervell, cor i fetge. En individus més joves, l'expressió de uPFK-2 (PFKFB3) és més generalitzada, s'expressa en tots els teixits ja que encara conserven certa capacitat de proliferació per tal d'assolir la maduresa (Duran et al., 2008). A més, durant la diferenciació muscular a les cèl·lules C2C12 (Fibroblast de ratolí), resultats publicats pel nostre laboratori demostren que durant la miogènesi disminueix l'expressió de la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) i del seu mRNA. Aquesta disminució també es correlaciona amb una reducció dels nivells de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub>. El nostre grup també va demostrar que la disminució en uPFK-2 (PFKFB3) durant la diferenciació miogènica era deguda a la degradació de la proteïna pel sistema del proteasoma (Riera et al., 2002). Per tant, seria plausible pensar que la desaparició de l'expressió de uPFK-2 (PFKFB3) que es dona en els animals adults fos deguda a la regulació exercida pel proteasoma. Recentment, hem pogut demostrar que en el fetge adult també es dona una disminució de l'expressió de la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) en comparació amb l'expressió



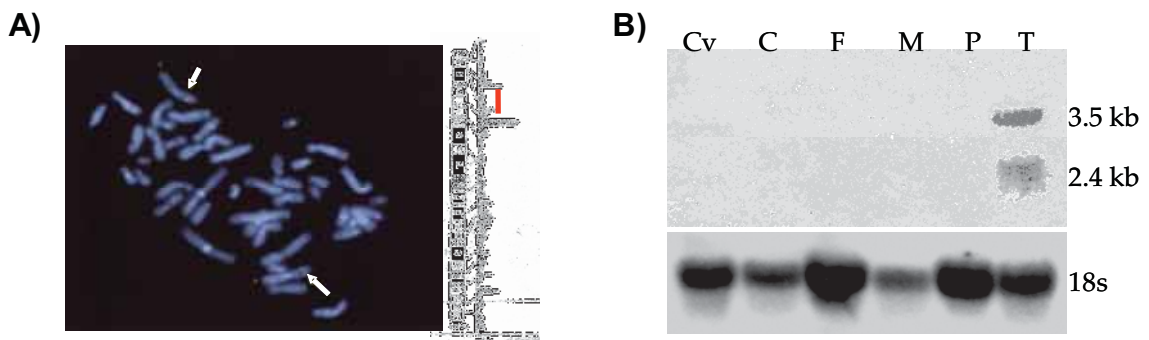
que hi havia en el fetge dels animals més joves (Duran et al., 2008). La reducció d'uPFK-2 (PFKFB3) es compensava per l'augment en l'expressió d'un dels altres isoenzims de la família de la PFK-2/FBPasa-2, en el múscul era mPFK-2 (PFKFB1) i en el fetge era RB2K3 (Duran et al., 2008; Riera et al., 2003).

Així doncs, l'isoenzim codificat pel gen *Pfkfb3* participaria dels mecanismes responsables d'induir la glucòlisi en els sistemes proliferants, tant en els sistemes tumorals com en els sistemes de maduració tissular.

Una característica important dels tumors, és que mentre estan en creixement i fins que no assoleixen unes dimensions determinades es troben en condicions d'hipòxia (Dang and Semenza, 1999). El gen *Pfkfb3* respon favorablement a la hipòxia, concretament per un mecanisme dependent de HIF1 $\alpha$  a diferents línies tumorals: de glioblastoma, de pàncreas com en línies de tumors gàstrics (Bobarykina et al., 2006; Fukasawa et al., 2004; Obach et al., 2004). Així com també als diferents òrgans d'un animal sotmès a la hipòxia (Minchenko et al., 2003).

### 1.12.- El gen *Pfkfb4*

El gen *Pfkfb4* es localitza al braç curt del cromosoma 3 humà, a la regió compresa entre les bandes p21-p22 (Figura 12 A), està format per 14 exons i 13 introns. Codifica per a la isoforma de testicle de la PFK-2 / FBPasa-2 (tPFK-2, PFKFB4) (Manzano et al,1999), de 55 kDa de pes molecular. En analitzar per Northern blot l'expressió d'aquest gen a diversos teixits de rata adulta (cervell, cor, fetge, múscul, pàncreas i testicle), només el testicle va resultar positiu, detectant-se dos transcrits, un majoritari de 2,4 kb i un minoritari de 3,3 kb (Manzano et al, 1999).



**FIGURA 12.** *Pfkfb4* humà. (A) Localització cromosòmica del gen *Pfkfb4* humà mitjançant la tècnica d'hibridació in situ (FISH). (B) Expressió del gen *Pfkfb4* a diferents teixits de la rata adulta: Cv: cervell, C: cor, F: fetge, M: múscul, P: pàncreas, T: testicle (Manzano et al., 1999).

Tanmateix, el grup de Minchenko i col·laboradors, mitjançant l'assaig de protecció de la ribonucleasa a diferents línies cel·lulars (Hep G-2, Panc-1 i DB-1), ha descrit l'aparició d'un splicing alternatiu només a la línia cel·lular de melanoma DB-1. Aquest splicing es forma per un insert de 148 parells de bases a l'extrem 5' del gen que codifica per un codó STOP al final, donant lloc a una proteïna que difereix a l'extrem N-terminal sent de menor pes molecular (Minchenko et al., 2005b).

Les característiques cinètiques de la tPFK-2 (PFKFB4) humana van ser descrites per Sakakibara i col·laboradors l'any 1997 (Sakakibara et al., 1997). Pel que fa a l'activitat cinasa, presenta una velocitat màxima lleugerament menor a la del mateix enzim de rata. Tot indica que les diferències es troben en l'afinitat per l'ATP, ja que l'isoenzim humà és menys sensible a la inhibició per ATP que l'isoenzim de rata. Respecte a l'activitat bisfosfatasa, la PFK-2 / FBPasa-2 humana, presenta quatre vegades més activitat que la de rata i, per tant, la relació cinasa/bisfosfatasa es troba disminuïda en la mateixa proporció, aproximant-se a l'equilibri (relació cinasa/fosfatasa: 0.9 a humans i 4.9 a rata).

Tot i que en un principi només es va descriure la presència de la tPFK-2 (PFKFB4) a testicle, avui dia s'ha trobat que és present a diferents línies cel·lulars de càncer, i que es sobreexpressa en condicions d'hipòxia (Taula 5).

Línia cel·lular	Model de càncer	Normòxia	Hipòxia
HepG2	Hepatoma	↓+	↑
Hep3B	Hepatoma	↓+	↑
MKN-45	Gàstric	-	↑
NUGC-3	Gàstric	-	↑
Panc-3	Pancreàtic	-	↑
MCF-7	Glàndula mamària	+	↑
T47D	Glàndula mamària	+	↑
MDA-MB468	Glàndula mamària	+	↑
BT-549	Glàndula mamària	↓+	↑
SKBR-3	Glàndula mamària	-	↑
HeLa	Cèrvix	-	↑
PC-3	Pròstata	-	↑
- (biòpsia humana)	Glioblastoma multiforme	+	ND

**TAULA 5: Expressió del gen *Pfkfb4* a diferents línies cel·lulars de càncer humà en normòxia o d'hipòxia.** Els símbols + i - indiquen l'expressió o la seva falta en condicions basals, respectivament. La fletxa indica un increment del mRNA en condicions d'hipòxia. ND: No descrit. Adaptat de Kessler et al., 2008; Minchenko et al., 2004; Minchenko et al., 2005a; Minchenko et al., 2005c.

Les cèl·lules canceroses presenten una elevada taxa glucolítica, produint una gran quantitat de lactat i piruvat en presència d'oxigen (efecte Warburg). Aquest fet es correlaciona amb un increment d'expressió dels enzims glucolítics i dels transportadors de glucosa. Així mateix, la sobreexpressió dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* a les línies canceroses en condicions d'hipòxia indicaria que podrien tenir un paper significatiu en l'efecte Warburg.

## 1.12. Expressió i regulació gènica durant l'espermatogènesi.

La formació de les cèl·lules germinals masculines, és a dir, l'espermatogènesi, es subdivideix en tres fases: mitòtica, meiòtica i postmeiòtica. Durant aquestes fases els gens que s'hi expressen codifiquen d'una banda per les proteïnes que són necessàries en els processos específics que s'hi donen (per exemple, a la fase postmeiòtica es dona el reemplaçament de les histones per les protamines i la posterior condensació de la cromatina, que comporta una aturada en la transcripció). I de l'altra, també s'hi expressen aquells gens que codifiquen per a proteïnes encarregades de mantenir les funcions cel·lulars, més coneguts com a *house-keeping* gens.

El procés de l'espermatogènesi és força complex, alguns dels successos que tenen lloc són semblants als que es donen en qualsevol teixit proliferatiu com per exemple la renovació constant dels espermatogonis (renovació de les *stem cells*) i el pas d'un sistema cel·lular poc diferenciat morfològicament a un de molt més diferenciat morfològic i funcionalment. En conseqüència, es necessita un programa precís que reguli el patró d'expressió gènica, ja que molts dels gens que s'activen durant aquest procés presenten diferències d'expressió temporals i espacials (Eddy, 2002; Kleene, 2003). Alguns d'aquests gens codifiquen per a proteïnes amb funcions específiques en les cèl·lules germinals, altres s'expressen seguint els patrons de desenvolupament de les cèl·lules germinals, i l'últim tipus gènica només es transcriu a les cèl·lules espermatogèniques. Aquests gens es poden dividir en tres grups:

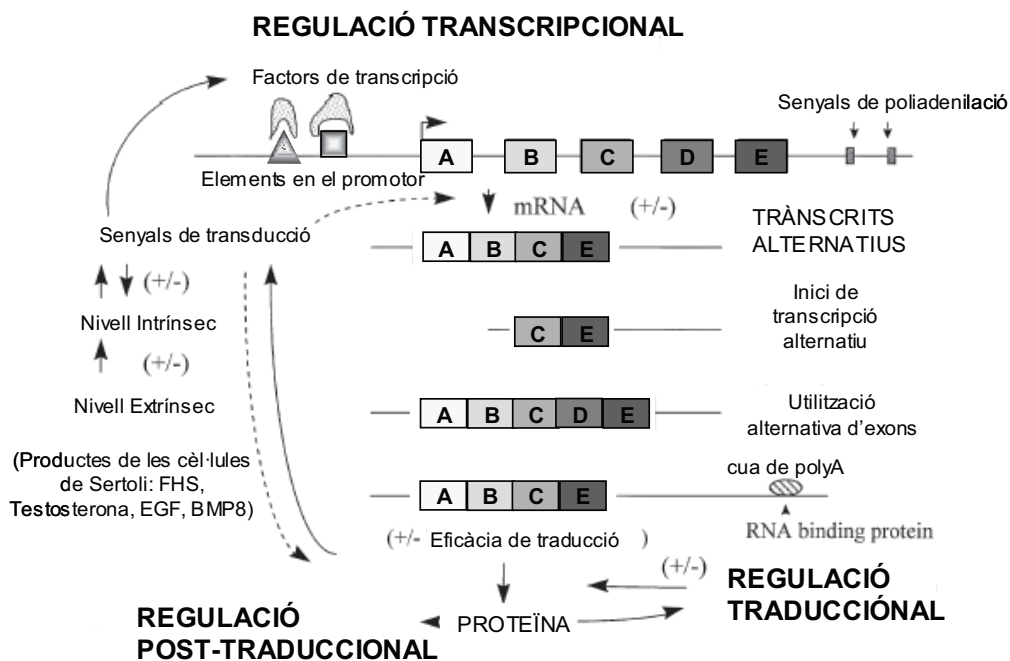
1. Gens homòlegs. Són aquells gens que s'expressen de forma específica a les cèl·lules germinals però que guarden similituds amb els gens que es troben expressats a les cèl·lules somàtiques. Acostumen a ser membres de la mateixa família. El gen somàtic es troba actiu durant tota la fase meiòtica i el gen específic s'activa a la fase postmeiòtica. El gen específic presenta propietats diferents al somàtic. Un exemple el trobaríem en el gen que codifica per l'enzim gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa: *Gapd*, que està considerat com un gen d'expressió generalitzada i se sol usar per tal de normalitzar la quantitat de RNA en diverses tècniques com el Northern blot o la

PCR a temps real. Aquest gen es troba inactiu en la fase meiòtica de l'espermatogènesi i el seu homòleg específic de les cèl·lules germinals, *Gapds*, és activat durant la fase postmeiòtica del desenvolupament germinal (Mori et al., 1992; Welch et al., 2000; Welch et al., 1992). A més, la proteïna GAPDH-s es diferencia de la isoforma ubiqua (GAPDH) perquè presenta un domini ric en prolines a l'extrem N-terminal que li permet anellar-se al citoesquelet de l'espermatozoide juntament amb altres enzims glucolítics (Bunch et al., 1998; Mori et al., 1992)

2. Gens únics. Són aquells gens que codifiquen per a proteïnes que només s'expressen a les cèl·lules germinals i que no s'assemblen a cap altre proteïna expressada al llinatge somàtic. Molts d'aquests gens s'expressen durant la fase postmeiòtica, quan es produeixen els components estructurals específics dels espermatozoides, per exemple les protamines. A la fase postmeiòtica es donen tots els canvis morfològics necessaris per tal de produir una cèl·lula aerodinàmica capaç de transmetre el material genètic patern a l'òvul. Per aquest motiu, el nucli de les espermàtides rodones es condensa i es remodela fins a una forma falciforme en les rates/ratolins i ovoide en els homes. Aquests canvis morfològics ocorren gràcies al reemplaçament de les histones primer per unes proteïnes de transició i posteriorment per les protamines.
3. Gens amb trànscripats únics. Són aquells trànscripats provinents de gens somàtics que al ser expressats al llinatge germinal tenen mides diferents. Es generen per diferents mecanismes: promotors alternatius, factors de transcripció específics, incorporació o alternança d'exons, splicings alternatius específics o diferent lloc de poliadenilació. Com per exemple el gen que codifica per l'enzim Hexocinasa-1 específic de la línia germinal (*Hk-1s*), que dona lloc a tres trànscripats: *Hk1-sa*, *Hk1-sb* i *Hk1-sc*. Els tres cDNAs difereixen entre si en la regió 5' no traduïda. Mitjançant anàlisis per Northern blot s'ha identificat que *Hk1-sa* és el primer en expressar-se tot i que ho fa en baixos nivells durant la meiosi. *Hk1-sb* és el més abundant i només es detecta en les cèl·lules postmeiòtiques. La proteïna HK-1s s'expressa principalment a la peça principal del flagel, essent la mateixa regió on també es localitzava GAPD-s (Bunch et al., 1998; Mori et al., 1998).

En atenció a això, durant l'espermatogènesi la regulació de l'expressió gènica a les cèl·lules germinals masculines es dona a tres nivells: intrínsec, interactiu i extrínsec (Eddy, 2002; Kleene, 2003).

**NIVELL INTRÍNSEC:** correspon a tots aquells mecanismes que determinen quins gens són els que s'expressen i quan. Responen a un programa genètic conservat al llarg de l'evolució, encarregat de coordinar la seqüència de fets ocorreguts a la diferenciació i a la morfogènesi que tenen lloc durant la progressió de l'espermatogènesi. Es dona a nivell transcripcional, traduccional i postraduccional segons es mostra a l'esquema de la Figura 13. La regulació a nivell transcripcional s'efectua gràcies a l'acció de factors de transcripció específics del teixit o del tipus cel·lular o bé gràcies a l'existència de promotors alternatius. També s'aconsegueix regular l'expressió per mitjà de trànscrips alternatius. El control exercit sobre la transcripció acaba repercutint sobre l'eficiència en la traducció, que pot veure's incrementada o reduïda. En la regulació postraduccional de la proteïna intervenen factors externs com són alguns dels productes generats i secretats al medi per les cèl·lules de Sertoli o les hormones FSH i/o testosterona (Eddy, 1998; Eddy, 2002).



**FIGURA 13. Regulació intrínseca de l'expressió gènica durant l'espermatogènesi.** Té lloc a tres nivells: transcripcional, traduccional i post-traduccional. Adaptat d'Eddy, 1998.

**NIVELL INTERACTIU:** Aquest tipus se centra en les relacions que s'estableixen entre les cèl·lules que conformem l'epiteli seminífer, especialment entre les cèl·lules de Sertoli i les germinals, les quals es relacionen de manera bidireccional. Les cèl·lules de Sertoli secreten més de 100 proteïnes diferents que condicionen el medi del túbul seminífer, amb factors que influeixen la divisió, la diferenciació i el metabolisme de les cèl·lules germinals (revisat en detall a l'apartat 1.5 d'aquesta introducció general).

Les cèl·lules germinals també estimulen i/o inhibeixen les diferents funcions de les cèl·lules de Sertoli. Les cèl·lules meiótiques i postmeiótiques produeixen factors de la família del TGF que

interaccionen i senyalitzen a les cèl·lules de Sertoli. També és gràcies a factors d'aquesta família proteica que les cèl·lules germinals es comuniquen entre elles. Així per exemple, les espermatides rodones produeixen BMP8B que actua regulant la supervivència i la diferenciació dels espermatòcits primaris (Zhao et al, 1998).

NIVELL EXTRÍNSEC: aquest tipus agrupa el control exercit per les hormones, principalment a la testosterona, sobre l'expressió dels gens germinals (revisat en detall a l'apartat 1.4 d'aquesta introducció general).

Tanmateix, durant els fenòmens de remodelació de la cromatina que es produeixen a les espermatides la transcripció s'atura i és la **regulació postranscripcional de la síntesi proteica** qui té un paper essencial sobre el control de l'expressió de les diferents proteïnes. Malgrat l'aturada de la transcripció durant l'espermioogènesi, es necessiten proteïnes sintetitzades *de novo* per al desenvolupament morfològic de la cèl·lula espermàtica. Per aquesta raó, la transcripció de moltes proteïnes presents als espermatozoides comença a les espermatides rodones, i els transcrits són traduïts seguint la maduració i l'elongació de les espermatides (Tanaka and Baba, 2005). De fet, tots els mRNAs de les cèl·lules espermatogèniques meiótiques i postmeiótiques dels mamífers es troba, en cert grau, reprimits transcripcionalment. I cada mRNA de forma individual exhibeix diferències en quant a la repressió i als canvis en l'activitat traduccional en funció del desenvolupament germinal (Kleene, 2001; Kleene, 2003).

La regulació postranscripcional pot donar-se seguint tres patrons diferents depenent d'on s'expressi l'mRNA, (a) a les cèl·lules somàtiques i als espermatogonis, (b) als espermatòcits i a les espermatides rodones o (c) a les espermatides rodones i a les espermatides en elongació (Kleene, 2003).

(a) L'activitat traduccional tant en les cèl·lules somàtiques testiculars com en els espermatòcits és típicament la que presenta qualsevol cèl·lula somàtica de qualsevol teixit (Kleene, 1996).

(b) L'activitat traduccional en els espermatòcits en fase de paquitè es troba parcialment reprimida, es dona en un nombre petit de transcrits. Per tant els mRNAs que es regulen seguint aquest patró, estan parcialment reprimits en els espermatòcits en fase de paquitè i són transcripcionalment més actius en les espermatides rodones, per exemple l'mRNA de l'enzim fosfoglicerat cinasa-2 (*Pgk-2*) (Gold et al., 1983a).

(c) L'activitat traduccional en les espermatides està influïda per la inactivitat transcripcional, característica d'aquestes cèl·lules, deguda als canvis en l'estructura de la cromatina. Com a resultat, els transcrits es troben reprimits a les espermatides rodones i s'activen en les

espermàtides en elongació. Aquest patró d'expressió es dona a la majoria de mRNAs, per exemple els mRNAs corresponents a les *Protamines 1 i 2* (*Prm1* i *Prm2*) o a la *Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa-s* (*Gapd-s*) (Bunch et al., 1998).

Per tal d'aconseguir que cada transcrit s'expressi en el tipus cel·lular i en el moment de temps que li toca les cèl·lules espermatozòiques han desenvolupat diferents mecanismes. Entre ells, destaca la presència de proteïnes que reconeixen de forma específica elements *cis-* dels mRNAs, s'hi uneixen i reprimeixen o estimulen la transcripció.

En conclusió, la regulació de la transcripció i la traducció durant la producció dels espermatozoides és un procés altament complex, quasi comparable a la regulació que té lloc en els primers estadis del desenvolupament embrionari. Hi intervenen múltiples factors tant extracel·lulars (hormones, proteïnes amb funció paracrina, etc), com factors intracel·lulars (proteïnes repressores/activadores de la transcripció i elements *cis*-reguladors en els promotors) i també són especialment importants les relacions que s'estableixen entre les cèl·lules de l'epiteli seminífer. Per tant, tots ells s'han de tenir en compte a l'hora d'estudiar l'expressió de qualsevol proteïna en el testicle .





---

## **2.- OBJECTIUS**

---

*Un hombre que se decide a hacer algo sin pensar en otra cosa,  
salvará todos los obstáculos  
(Giacomo Casanova)*



Els objectius principals d'aquesta tesi són:

- 1.- Estudi de l'expressió dels isoenzims PFKFB3 i PFKFB4 en el testicle adult de rata i durant el seu desenvolupament.
- 2.- Clonatge de la regió 5'- promotora del gen *Pfkfb4* i caracterització de la seva regulació transcripcional en resposta a diversos factors transcripcionals.
- 3.- Estudi de la influència de la regulació hormonal sobre l'expressió dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* producte de l'acció paracrina de les cèl·lules de Sertoli.

Cadascun d'aquests objectius principals es desglossa amb els següents objectius específics:

- 1.- Estudi de l'expressió dels isoenzims uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en el testicle adult de rata i durant el seu desenvolupament.
  - 1.1) Disseny d'un anticòs específic contra la proteïna tPFK-2 (PFKFB4).
  - 1.2) Caracterització de l'expressió dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* en testicle en desenvolupament i durant l'espermatogènesi.
  - 1.3) Estudi de l'expressió de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en els diferents tipus cel·lulars presents al testicle mitjançant:
    - 1.3.1) Aïllament de fraccions cel·lulars per centrifugació diferencial.
    - 1.3.2) Immunofluorescències de crioseccions durant l'espermatogènesi.
  - 1.4) Estudi de l'expressió de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) durant l'espermioogènesi.
  - 1.5) Estudi de l'expressió de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en models tumorals testiculars.

2.- Clonatge de la regió 5'- promotora del gen *Pfkfb4* i caracterització de la seva regulació transcripcional en resposta a diversos factors transcripcionals.

2.1) Caracterització de l'inici de transcripció, la regió mínima promotora i la resposta d'aquest promotor a factors mitogènics (Sèrum i PDB).

2.2) Caracterització de la resposta del promotor *Pfkfb4* a la hipòxia i estudi de la implicació del factor induïble per hipòxia (HIF1) en aquesta.

2.3) Caracterització dels efectes del factor de transcripció Sp1 sobre el promotor *Pfkfb4* i la influència del sèrum o la hipòxia en aquesta resposta.

2.4) Caracterització dels efectes del factor de transcripció c-Myc sobre el promotor *Pfkfb4* i de la influència del sèrum, Sp1 o la hipòxia en aquesta resposta.

3.- Estudi de la influència de la regulació hormonal sobre l'expressió dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* producte de l'acció paracrina de les cèl·lules de Sertoli.

3.1) Estudi dels efectes de les hormones esteroïdals, testosterona i estradiol, sobre l'expressió de tPFK-2 (PFKFB4).

3.2) Avaluació de la implicació dels factors alliberats al medi per les cèl·lules de Sertoli després d'un tractament hormonal sobre l'expressió de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4).

---

### 3. - RESULTATS

---

iA galopar,  
a galopar,  
hasta enterrarlos en el mar!  
Nadie, nadie, nadie, que enfrente no hay nadie;  
que es nadie la muerte sí va en tu montura.  
Galopa, caballo cuatralbo,  
jinete del pueblo,  
que la tierra es tuya.  
iA galopar,  
a galopar,  
hasta enterrarlos en el mar!  
(A galopar. Rafael Alberti)



---

**I .**

---

---

**ESTUDI DE L'EXPRESSIONI DE PFK-2/FBPasa-2 EN TESTICLE.**

---

El primer objectiu que ens vàrem plantejar fou l'estudi de l'expressió de l'enzim bifuncional PFK-2/FBPasa-2 en el testicle, un model que es caracteritza per l'alta proliferació cel·lular i la posterior diferenciació.

Per tal d'acomplir-ho es va generar un anticòs específic contra la proteïna tPFK-2 (PFKFB4). Es va estudiar l'expressió dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* al testicle durant el desenvolupament de la rata: en els últims estadis fetals, a l'individu jove, prepúber i a l'adult. Igualment, es va estudiar l'expressió de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) a cèl·lules testiculars aïllades així com a seccions histològiques de testicle per tal de localitzar en quin tipus cel·lular s'hi expressen. A més, també es va analitzar la seva expressió durant el procés de maduració dels espermatozoides.

Finalment, es va estudiar la relació entre les proteïnes PFKFB3 (uPFK-2) i PFKFB4 (tPFK-2) en processos tumorals testiculars.

## INTRODUCCIÓ

L'espermatogènesi és un procés de constant proliferació i diferenciació cel·lular pel qual les cèl·lules germinals més immadures o **espermatogonis** mitjançant mitosi produiran els **espermatòcits** primaris o preleptotens. Després de duplicar el seu DNA, i passant per dues divisions meiótiques amb diferents estadis madurats (leptotens, zigotens, paquitens i diplotens) que donaran lloc, en primer terme, als espermatòcits secundaris, amb un nombre senzill de cromosomes ( $2n$ ) i, al final de la segona divisió meiótica, aquests espermatòcits secundaris esdevindran **espermàtides rodones** haploides (Figura 1.1). La fase final de l'espermatogènesi, coneguda com espermiogènesi, consisteix en una sèrie de canvis morfològics pels quals les espermàtides rodones es transformen en **espermàtides en elongació** que surten al lumen del túbul seminífer. Aquestes acabaran de madurar a l'epidídim on es tornaran mòbils esdevenint **espermatozoides** madurs.

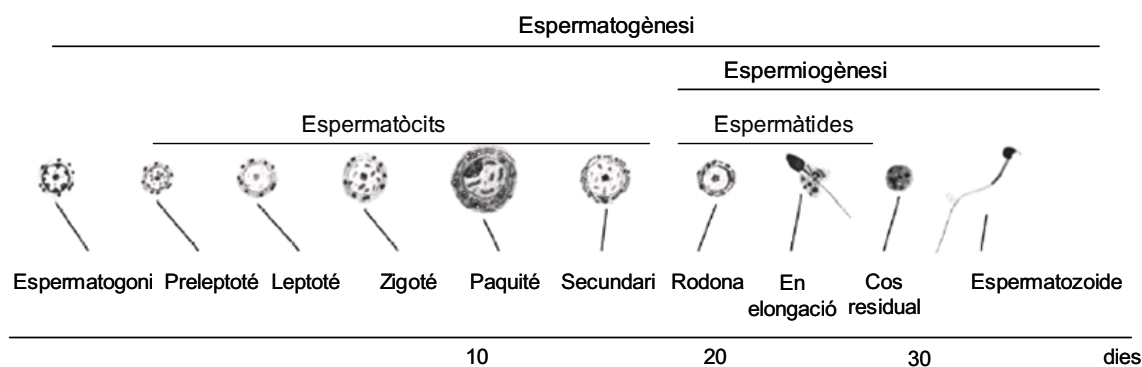


FIGURA 1.1. Esquema temporal del procés espermatogènic. Adaptat de Thomas et al., 2007.

Totes les fases de l'espermatogènesi tenen lloc mentre els gàmetes en desenvolupament es troben en associació amb les cèl·lules de Sertoli, que s'estenen des de la làmina basal fins al lumen del túbul seminífer. Com es representa a la Figura 1.2, les cèl·lules de Sertoli proporcionen

els factors necessaris per la progressió de les cèl·lules germinals a espermatozoides, donant el suport físic o bé l'estimulació bioquímica, en forma de factors de creixement o nutrients que les cèl·lules necessiten durant el procés de diferenciació.

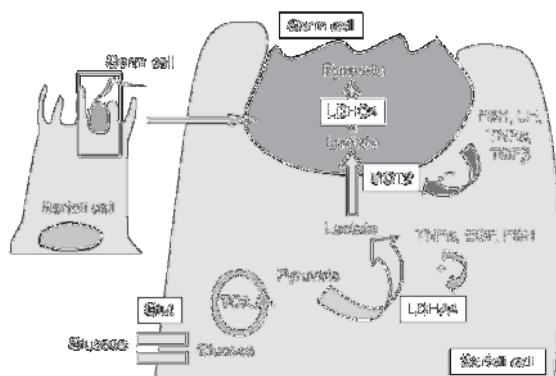
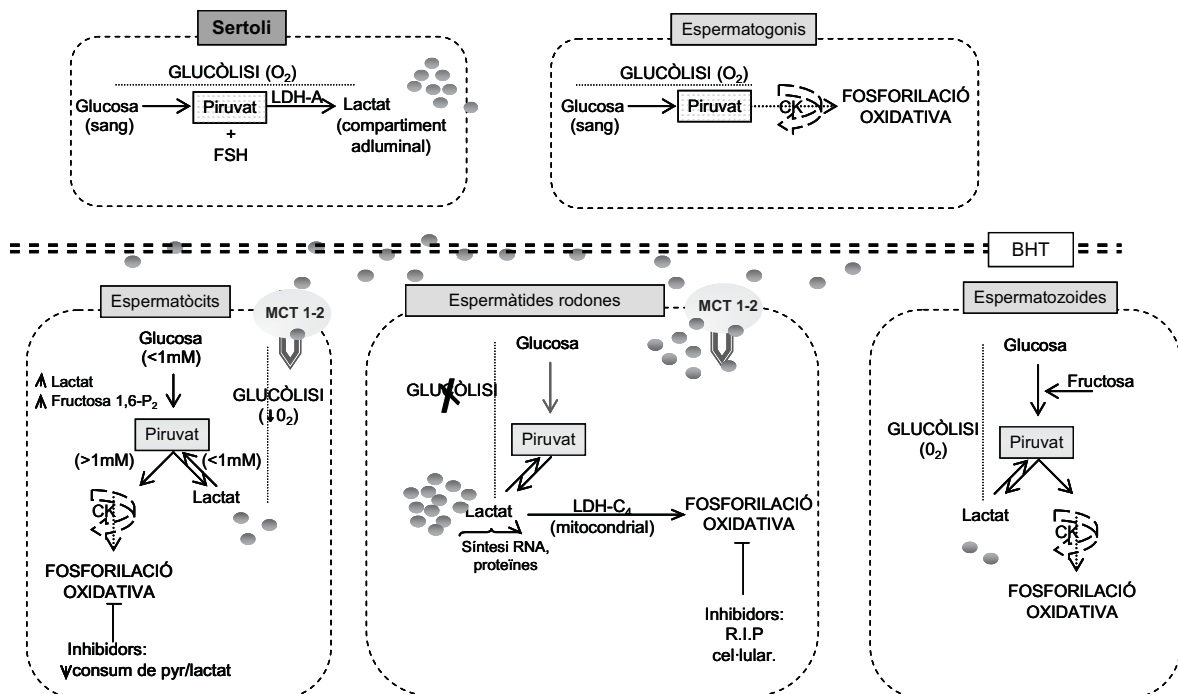


FIGURA 1.2. Esquema de la cooperació que s'estableix entre una cèl·lula de Sertoli i una germinal.



Metabòlicament, durant aquest procés, els substrats que s'utilitzen en el metabolisme energètic i les vies implicades varien (Bajpai et al., 1998). Els principals trets metabòlics de cada tipus germinal es resumeixen a la Figura 1.3.



**FIGURA 1.3. Esquema dels substrats i les principals vies metabòliques durant l'espermatogènesi.** Els espermatogonis utilitzen glucosa com a font d'energia, mentre que els espermatòcits i les espermàtides fan servir el lactat produït per les cèl·lules de Sertoli que entra a les cèl·lules gràcies al seu transportador específic MCT (en gris es representa el lactat). Els espermatozoides poden oxidar glucosa, fructosa i lactat. LDH: lactat deshidrogenasa, FSH: Hormona estimulant del fol·licle, CK: cicle de Krebs, BHT: Barrera Hemato-testicular.

Els **espermatogonis** utilitzen glucosa que prové de la sang com a font d'energia i aquesta serà metabolitzada seguint la glucòlisi i el cicle de Krebs (Nakamura et al., 1984a). En canvi, els espermatòcits i les espermàtides, en estar dins de la Barrera Hemato-Testicular (BHT), utilitzen majoritàriament el lactat produït per les cèl·lules de Sertoli com a substrat energètic.

Per la seva banda, els **espermatòcits** en cultiu, preferentment, utilitzen piruvat i lactat com a font energètica i, en últim terme, glucosa. Malgrat que es dona una interconversió entre el piruvat i el lactat, la direcció principal del metabolisme del piruvat depèn de la seva pròpia concentració (Figura 1.3). És a dir, si la concentració d'aquest metabòlit és inferior o igual a 1mM, aleshores serà reduït a lactat a gran velocitat. Però, si incrementa per sobre de 1mM, la conversió de piruvat a lactat és realitzarà a la mateixa velocitat que l'oxidació en el cicle de Krebs. Així doncs, aquestes cèl·lules presenten la característica avantatjosa de poder triar entre la glucòlisi i la fosforilació oxidativa. Aquesta característica queda palesa quan es cultiven amb inhibidors de la cadena respiratòria, com

per exemple la rotenona, ja que els espermatozoïdes viuen però amb un menor consum de piruvat/lactat i una disminució en la producció d'ATP. Per tant, el seu metabolisme no depèn exclusivament de la cadena respiratòria (Jutte et al., 1981; Nakamura et al., 1984a).

Contràriament als espermatozoïdes, les **espermàtides rodones** són altament dependents del lactat i de la fosforilació oxidativa; és a dir, que han perdut la capacitat de triar entre la glucòlisi i el cicle de Krebs. De fet, si es compara l'activitat dels enzims glucolítics en els dos tipus cel·lulars, resulta ser molt menor a les espermàtides (Jutte et al., 1981; Mita and Hall, 1982; Nakamura et al., 1982). Així doncs, en cultivar-les amb un medi ric en glucosa, els nivells d'ATP cauen i augmenta la Fructosa-1,6-P<sub>2</sub>. De la mateixa manera, el cultiu amb inhibidors de la cadena respiratòria els provoca la mort (Bajpai et al., 1998; Nakamura et al., 1982; Nakamura et al., 1984b; Nakamura et al., 1986).

Al final de l'espermatogènesi, els **espermatozoides** tornen a tenir una elevada capacitat glucolítica, i són capaços d'oxidar aeròbicament el lactat, la glucosa i la fructosa (Bajpai et al., 1998). Però, tenint en compte que el fluid dels túbuls seminífers està enriquit amb lactat, seria aquest metabòlit l'usat preferiblement per part dels espermatozoides. Així, es posa de manifest la importància del lactat durant tota la fase postmeiòtica de l'espermatogènesi.

Un punt clau de control del flux glucolític es troba en la reacció catalitzada per l'enzim 6-fosfofructo-1-cinasa sent la Fructosa-2,6-P<sub>2</sub> el seu major activador alostèric. L'enzim encarregat de catalitzar tant la seva síntesi com la seva degradació és la PFK-2/FBPasa-2. Treballs en el nostre laboratori (Duran et al., 2008; Manzano et al., 1999; Riera, 2002) van demostrar que en el testicle es detectava la presència de dos isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2, els isoenzims codificats pels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4*, uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4), respectivament. La presència de dos isoenzims diferents provinents de gens independents i amb promotors específics dins un mateix teixit, suggereix que aquests isoenzims podrien exercir funcions diferents, localitzar-se en diferents cèl·lules i respondre a factors hormonals específics o depenent de les condicions fisiològiques. Tot això implicaria l'existència d'una regulació metabòlica complexa.

La presència en testicle de dos isoenzims per a una mateixa proteïna obre preguntes sobre el possible paper biològic de cadascun d'ells en el metabolisme del testicle. Els treballs realitzats en aquest capítol s'han centrat en determinar l'expressió de la PFK-2/FBPasa-2 en el testicle mitjançant l'estudi d'ambdues proteïnes, uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4), durant la formació i maduració del testicle i, finalment en el procés de maduració dels espermatozoides.

## RESULTATS

### Producció d'anticossos policlonals específics contra la PFKFB4.

Degut a la manca d'un anticòs que detectés específicament la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) de rata i/o humana, es va plantejar, com a primer objectiu, la producció al laboratori d'un anticòs policlonal per detectar-la. Fins el moment, s'estava emprant un anticòs comercial policlonal, anomenat anti-L-PFK-2 (PFK-2 liv (E-16): sc-10096; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) que reconeix part de la regió carboxi-terminal de la proteïna PFK-2 hepàtica humana. Aquesta regió és comuna pels isoenzims de L-PFK-2 (PFKFB1) i tPFK-2 (PFKFB4) de rata, ratolí i humà, ja que ambdues proteïnes comparteixen un 75% d'homologia en la seva seqüència amino àcida.

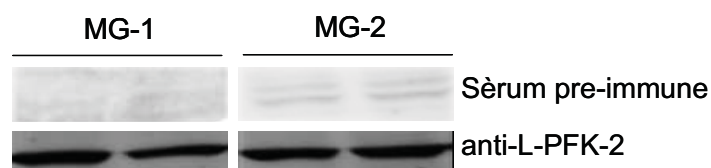
Amb aquest objectiu es va seleccionar com antigen un pèptid de 16 residus de la zona amino-terminal de la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) de rata: (NH<sub>2</sub>)-YSNGRPALHASQRGVCM-(COOH). Aquest pèptid només difereix en un únic aminoàcid de la seqüència humana (en humans la S en vermell és una C) i és específic per l'isoenzim tPFK-2 (PFKFB4), com s'observa a la Figura 1.4 en l'alineament de l'extrem amino-terminal de les quatre proteïnes humanes.

<b>PFKFB 1</b>	MSP <b>EM</b> GELTQ <b>TR</b> LQKIWI <b>PH</b> S <b>SG</b> SSRLQRRRGSSIPQFTNSPTM <b>VIM</b> VGLPARGKTYIS <b>T</b>
<b>PFKFB 4</b>	MASPR-ELTQ <b>N</b> PLK <b>KI</b> FMP <b>YSNGRPALHA</b> <b>C</b> Q <b>R</b> G-- <b>V</b> CM <b>T</b> NCPTLIVM <b>V</b> GLPARGKTYIS <b>K</b>
<b>PFKFB 3</b>	MP---LELTQ <b>S</b> RVQKI <b>W</b> VP <b>VDH</b> -RPSLPR <b>S</b> CG---PKLTNSPTV <b>I</b> VMVGLPARGKTYIS <b>K</b>
<b>PFKFB 2</b>	MS---G <b>AS</b> SEQN <b>N</b> SYET <b>K</b> TPNL <b>R</b> MSE <b>K</b> KCSW <b>AS</b> YMTNSPTV <b>I</b> VMVGLPARGKTY <b>V</b> SK
<b>Consensus</b>	M-----eltqt-lqkiwip-----l-----MTNsPTmivMvGLPARGKTYisk

**FIGURA 1.4. Seqüència d'aminoàcids corresponent a l'extrem amino-terminal de les 4 proteïnes PFKFB humanes.** En blau es representen els residus que són diferents. En la seqüència consens s'hi assenyalen els residus plenament conservats (Majúscules) o els majoritaris dels quatre isoenzims alineats (Minúscules). En negreta s'assenyala el pèptid antigènic escollit per produir l'anticòs policlonal a partir de la seqüència de rata (en vermell s'assenyala l'aminoàcid diferent entre el pèptid humà i de rata).

Per la producció de l'anticòs específic es van emprar dos conills *New Zealand*, que es van anomenar MG-1 i MG-2. Passat el període de quarantena, es va extreure sang de cada animal per obtenir el sèrum pre-immune. Mitjançant un Western blot es va comprovar que el sèrum pre-immune no reconeixia la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) obtinguda a partir d'extractes proteics de cèl·lules 293 transfectades amb el plasmidi d'expressió tPFK2-pcDNA3. Com a control positiu, es va tornar a hibridar les membranes amb l'anticòs comercial anti-L-PFK-2 que, com ja s'ha esmentat, reconeix els dos isoenzims L-PFK-2 (PFKFB1) i tPFK-2 (PFKFB4) humans.

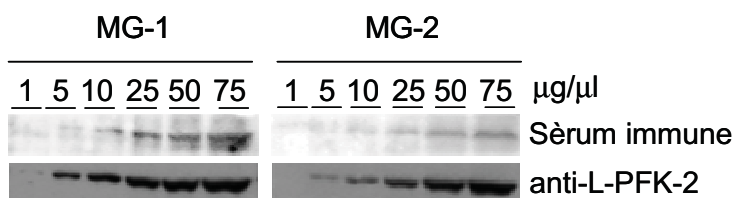
Tal com s'observa a la Figura 1.5, el sèrum pre-immune obtingut de l'animal MG-1 no va detectar cap senyal, mentre que l'obtingut de l'animal MG-2 va donar unes bandes tènues inespecífiques si es compara amb les bandes detectades per l'anticòs comercial anti-L-PFK-2.



**FIGURA 1.5. Western blot per comprovar la reactivitat del sèrum pre-immune.** Es va carregar 50 µg/µl d'extracte cel·lular 293 que sobreexpressa la proteïna tPFK-2 (PFKFB4). Els dos primers carrils es van hibridar amb el sèrum pre-immune que provenia del conill MG-1 (1/100), i els dos últims amb el sèrum pre-immune provenint del conill MG-2 (1/100). Seguidament, es va re-hibridar les membranes amb l'anticòs comercial anti-L-PFK-2 (1/250).

Un cop comprovada la manca de reactivitat dels sèrums pre-immunes enfront la proteïna tPFK-2 (PFKFB4), el pèptid antigènic conjugat a l'hemocianina (KLH) va ser injectat subcutàniament en la zona del llom a la base del coll dels conills, seguint les normatives del Comitè Ètic de la Universitat de Barcelona. Es van realitzar fins a 4 immunitzacions amb un interval de temps de 15 dies entre elles, fins a obtenir-ne una bona titulació dels anticossos.

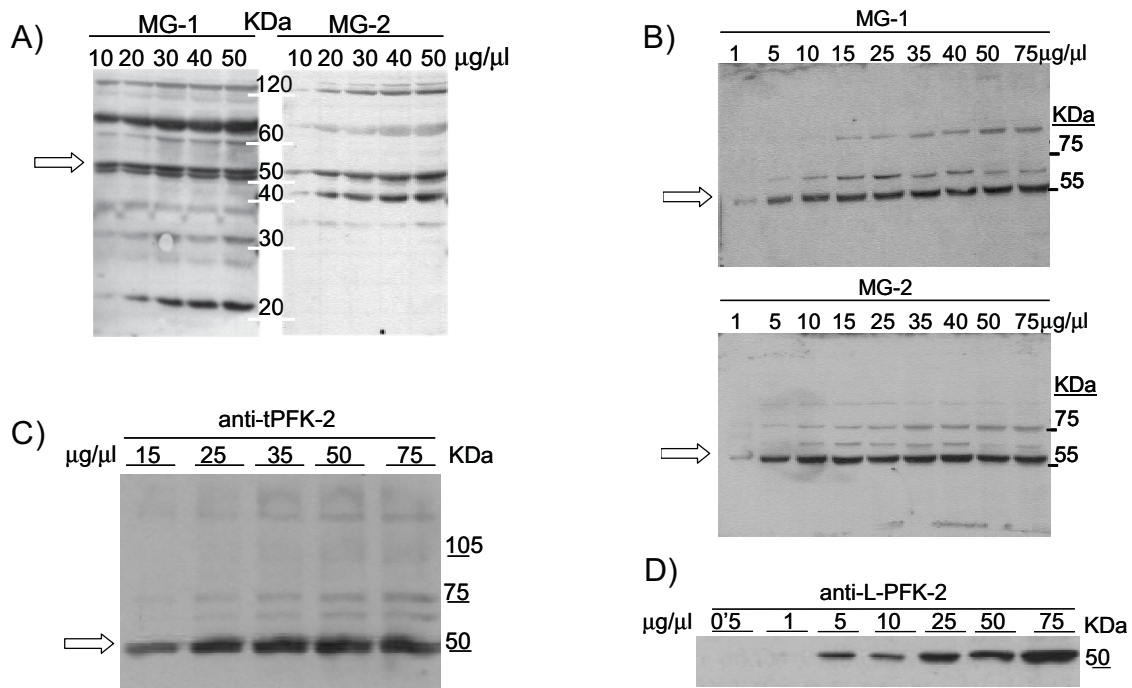
Mitjançant un Western blot es va assajar la reactivitat dels anticossos resultants, anomenats MG-1 i MG-2, utilitzant directament el concentrat de sèrum sense purificar.



**FIGURA 1.6. Titulació dels anticossos MG-1 i MG-2.** En un Western blot, es va carregar diferents quantitats d'extracte de cèl·lules 293 sobreexpressant l'isoenzim tPFK-2 (PFKFB4). La membrana de l'esquerra es va hibridar amb el sèrum immune provenint del conill MG-1 (1/100) i la de la dreta amb el sèrum immune provenint del conill MG-2 (1/100). Seguidament, es va re-hibridar les membranes amb l'anticòs comercial anti-L-PFK-2 (1/250).

Com s'observa a la Figura 1.6, es va posar de manifest que aquests sèrums immunes detectaven una única proteïna de 55 kDa, que es correspon amb la mida esperada de tPFK-2 (PFKFB4). Per aquesta detecció, es van utilitzar diferents concentracions de proteïna a partir de l'obtinguda per sobreexpressió en extractes totals de cèl·lules 293 transfectades transitòriament amb la construcció tPFK-2-pcDNA3.

Però, els sèrums immunes presentaven una sensibilitat de detecció menor que l'anticòs comercial (anti-L-PFK-2). El sèrum directe del conill a més d'estar enriquit en l'anticòs d'interès també conté altres proteïnes sèriques, entre elles anticossos inespecífics que s'unirien a altres proteïnes de la membrana com es pot apreciar a la Figura 1.7 A.



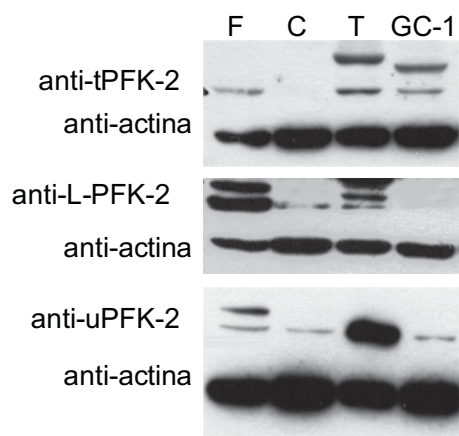
**FIGURA 1.7. Titulació de l'anticòs anti-tPFK-2.** Western blot amb diferents quantitats d'extractes proteics de testicle hibridat amb els sèrums MG-1 (1/100) i MG-2 (1/100) (A) sense purificar i (B) després de purificar. Western blots amb diferents quantitats d'extracte cel·lular de HuH7 sobreexpressant l'isoenzim tPFK-2 (PFKFB4). Les membranes es van hibridar amb els anticossos anti-tPFK-2 (C) purificat (1/100) i amb l'anticòs comercial L-PFK-2 (1/250) (D). (⇨ : banda corresponent a la proteïna tPFK-2 (PFKFB4)).

El següent pas va ser purificar l'anticòs mitjançant una cromatografia d'afinitat. Es va utilitzar com a suport una resina amb el pèptid antigènic, aquells que es va usar per generar els anticossos, unit covalentment per l'extrem C-terminal. D'aquesta manera només els anticossos contra la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) presents al sèrum s'unirien específicament a la columna, mentre que la resta seran eliminats. Amb posteriors rentats de la columna es poden obtenir fraccions enriquides amb l'anticòs d'interès, que es va anomenar anti-tPFK-2. Després de la purificació, per mitjà de diferents Western blots es va tornar a assajar el grau de sensibilitat de l'anticòs anti-tPFK-2. D'una banda, es van carregar diferents quantitats de proteïna a partir d'un extracte de testicle de rata (Figura 1.7 B) i de l'altra es va partir d'un extracte cel·lular de HuH7 que sobreexpressava la construcció tPFK-2-pcDNA3 humana (Figura 1.7 C). Com es pot observar a les Figures 1.7 B i C, en purificar l'anticòs es va

aconseguir incrementar el grau de sensibilitat en la detecció de tPFK-2 (PFKFB4) (detectable a partir de 10 µg de proteïna) i reduir les bandes degudes a unions inespecífiques.

A part d'analitzar la sensibilitat de detecció també calia avaluar l'especificitat de l'anticòs generat després de ser purificat. Amb aquesta finalitat es va realitzar un Western blot carregant 50 µg d'extractes proteics extrets de testicle, cervell i fetge d'una rata adulta. Es va realitzar la immunodetecció amb l'anticòs contra la tPFK-2 (PFKFB4) per veure, si com es pretenia, s'havia aconseguit produir un anticòs específic o bé presentava immunoreactivitat creuada amb alguna altra proteïna de la família (com L-PFK-2 (PFKFB1) o uPFK-2 (PFKFB3)). També es van fer dos immunodeteccions més, una amb l'anticòs comercial anti-L-PFK-2 i l'altre amb l'anticòs policlonal anti-uPFK-2 generat al laboratori (Riera et al., 2002), respectivament; com a control positiu del bon funcionament de la tècnica.

Com es pot observar a la Figura 1.8, el Western blot amb l'anticòs anti-tPFK-2 va reconèixer una proteïna endògena de 55 kDa que és present al testicle de rata i a la línia de cèl·lules germinals de ratolí GC-1spg, i apareixen en tots dos casos una altra banda de major grandària. Tanmateix, no va reconèixer cap proteïna a l'extracte cel·lular de cervell, mentre que a l'extracte cel·lular de fetge hi reconeix una banda única.

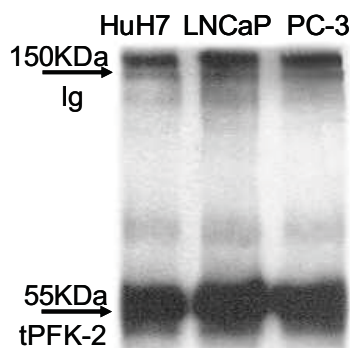


**FIGURA 1.8. Avaluació de l'especificitat de l'anticòs anti-tPFK-2.** Western blot d'extractes tissulars de testicle (T), cervell (C), fetge (F) que expressen, principalment, els isoenzims tPFK-2 (PFKFB4), uPFK-2 (PFKFB3) i L-PFK-2 (PFKFB1), respectivament, i cèl·lules GC-1spg (espermatòcits) Les membranes es van hibridar amb els anticòssos anti-tPFK-2, anti-uPFK-2, anti-L-PFK-2 i anti-β-actina com a normalitzador de càrrega.

La capacitat d'immunoprecipitar es va determinar examinant si l'anticòs podia precipitar la proteïna humana tPFK-2 (PFKFB4) sobreexpressada en d'extractes cel·lulars d'HuH7, així com la proteïna endògena d'extractes cel·lulars de dues línies de càncer de pròstata; LNCaP i PC-3. Però, es presentava l'inconvenient que la cadena pesada de l'anticòs, un cop desnaturalitzada, tenia un pes molecular similar a la de l'isoenzim de testicle (55 kDa) que podria emascarar el senyal del Western realitzat contra la tPFK-2 (PFKFB4). Per tal d'evitar aquest problema es va realitzar la immunoprecipitació en condicions no reductores, així s'afavoria l'estabilitat dels ponts disulfur inter i

intracatenaris dels anticossos. A més, es va evitar afegir cap agent reductor (com el DTT o el  $\beta$ -mercaptoetanol) en el tampó de mostra de proteïnes, ni tant sols es van bullir abans de carregar-les al gel desnaturalitzant (SDS-PAGE). Amb aquest ambient no reductor, s'aconsegueix que les cadenes de l'anticòs es mantinguin unides pels ponts disulfur i per tant pesin més (150 kDa) evitant interferències en el gel de poliacrilamida.

En aquestes condicions es va realitzar la immunoprecipitació de la proteïna seguit d'un Western blot amb l'anticòs policlonal contra la tPFK-2 (PFKFB4). Segons es recull a la Figura 1.9, es va aconseguir immunoprecipitar la proteïna sobreexpressada amb una interferència mínima de les cadenes pesades de l'anticòs. A més, també es va precipitar la proteïna endògena present a les línies tumorals de pròstata LNCaP i PC-3.



**FIGURA 1.9. Immunoprecipitació en condicions no reductores de la tPFK-2 (PFKFB4).** Immunoprecipitació de la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) sobreexpressada en cèl·lules HuH7 i de la proteïna endògena de les línies tumorals de pròstata LNCaP i PC-3.

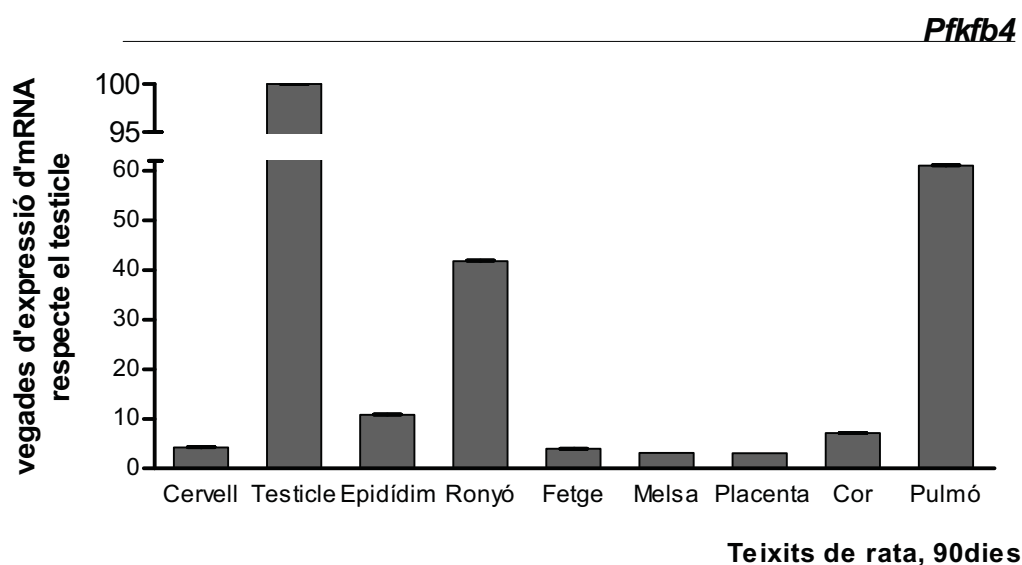
Aquests resultats demostraven que es disposava d'un bon anticòs per seguir la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) humana, de rata i de ratolí, ja que reconeixia específicament la isoforma amb una sensibilitat acceptable (de l'ordre de 15-10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteïna). A més, permetia immunoprecipitar tant la proteïna sobreexpressada en cèl·lules eucariotes com l'endògena de dues línies tumorals de pròstata, fet que podia ser molt útil per la realització de posteriors estudis immunohistoquímics.

### Estudi de l'expressió del gen *Pfkfb4* per RT-PCR en els teixits adults de rata.

Paral·lelament a la clonació del gen *Pfkfb4* humà, en treballs anteriors del laboratori per Northern blot s'havia determinat que la seva expressió estava restringida només a testicle d'entre diferents teixits de rata analitzats; cervell, cor, fetge, múscul, pàncreas (Manzano et al, 1999). En el present treball es va reproduir l'estudi utilitzant la tècnica de la PCR a temps real i les sondes validades per *Applied Biosystems*, específiques per als gens *Pfkfb 3*, i *4* de rata, tot ampliant els teixits analitzats amb epidídim, ronyó, melsa, pulmó i placenta (a dia 19 de gestació). Es varen utilitzar les

sondes específiques predisenjades per *Applied Biosystems* (referències; *Pfkfb4*: Rn\_00570987\_m1 i *Actina*: Rn\_00667869\_m1).

Tal com es mostra a la Figura 1.10, i prenentagafant l'expressió del gen *Pfkfb4* a testicle com a valor de referència (al que se li va assignar el valor de 100), es va poder determinar que també es trobava present en altres teixits, tot i ser en un percentatge més baix. Essent només ronyó i pulmó els teixits que mostraven una expressió relativa superior al 40% respecte el màxim d'expressió del testicle.



**FIGURA 1.10. PCR a temps real de la distribució del gen *Pfkfb4* als teixits de rata de 90 dies.** Els resultats s'expressen com a percentatge d'mRNA respecte la quantitat present al testicle, que va rebre el valor de 100. Es va fer servir actina com a normalitzador i els resultats es van calcular pel mètode del  $\Delta\Delta C_t$  (segons s'explica als materials i mètodes).

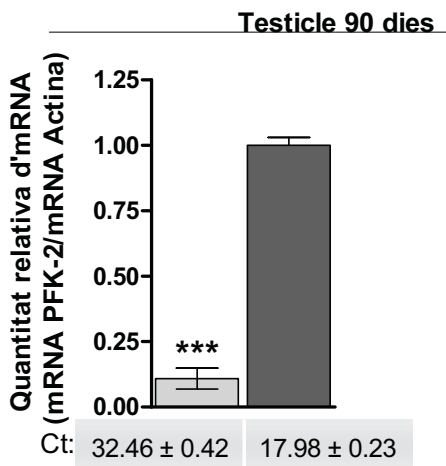
Els resultats aquí presentats ens permetien validar la tècnica de PCR a temps real i reafirmar la seva utilitat per a estudis posteriors previstos entre els objectius d'aquesta memòria de tesi doctoral.

### Estudi de l'expressió dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* en el testicle adult de rata

Segons estudis al nostre laboratori (Duran et al., 2008; Manzano et al., 1999; Riera, 2002) i també amb el Western blot de comprovació de l'especificitat de l'anticòs anti-tPFK-2, es va poder constatar que al testicle adult de rata es troben expressades les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4). Amb la finalitat d'examinar els nivells de mRNA d'ambdós gens al testicle adult, es va realitzar una PCR a temps real. Com es pot veure a la Figura 1.11, en el testicle adult es detectaven



els mRNAs dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* (Rn\_00589179\_m1), essent el mRNA del gen *Pfkfb4* el més abundant. L'expressió del gen *Pfkfb3* representava només un 10% respecte l'expressió de *Pfkfb4*.



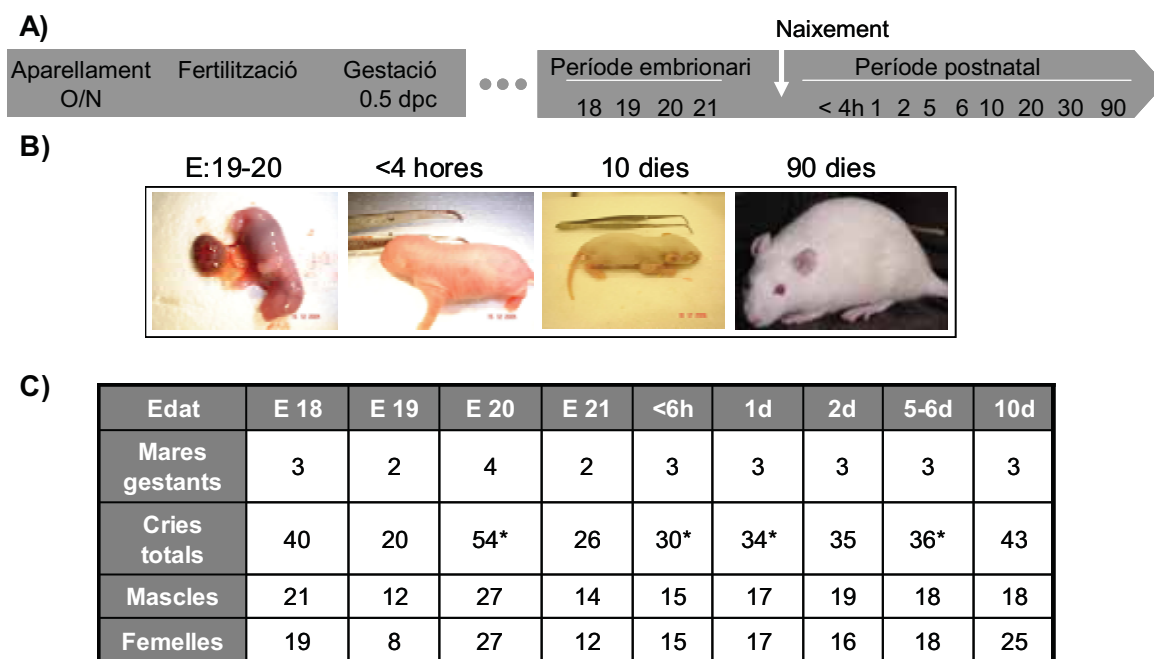
**FIGURA 1.11. Expressió de *Pfkfb3* i *Pfkfb4* al testicle de la rata adulta.** PCR a temps real de la distribució dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* al testicle de rata de 90 dies. Els resultats es van calcular pel mètode del  $\Delta\Delta Ct$ , i s'expressen com a quantitat relativa de mRNA respecte la quantitat que té el gen *Pfkfb4*, que va rebre el valor de 1. A sota es mostra la mitjana de les Ct obtingudes per a cada sonda. (\*\*\*)=( $P < 0.001$ ).

Per tal d'aprofundir en el possible significat que pugui tenir l'expressió d'aquests gens en el testicle s'ha de considerar la heterogènia composició cel·lular del testicle. L'epiteli seminífer es caracteritza per la seva complexitat estructural, amb cèl·lules germinals en proliferació i diferenciació constant intercalades entre les cèl·lules de Sertoli (veure Figura 1 de la introducció general). L'espai intersticial també presenta una alta diversitat cel·lular amb teixit vascular, limfàtic, connectiu, macròfags, fibroblastes i les cèl·lules de Leydig. Conseqüentment, es feia necessari un estudi en detall de l'expressió de uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en relació amb la complexitat estructural de l'epiteli i la fisiologia del testicle que pugués aportar informació per deduir en quin moment i tipus cel·lular és important l'expressió d'un o altre isoenzima i el paper biològic que poden jugar cadascun d'ells en la regulació del metabolisme de la glucosa.

### Estudi de l'expressió dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* al testicle en desenvolupament.

Amb la intenció de determinar el moment d'aparició dels isoenzims uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) durant el desenvolupament del testicle a la rata, es va fer un estudi temporal a diferents períodes embrionaris (E18, 19, 20 i 21 dies) i postnatsals (P <4 hores, P1, 2, 5, 6, 10, 20, 30 i 90 dies). Per a aquesta finalitat es va realitzar el disseny experimental exposat a la Figura 1.12A, amb un calendari d'aparellaments controlats per poder identificar i classificar a les famelles prenyades. La identificació de les mares gestants era crucial per tal de seguir de forma exhaustiva la gestació i realitzar les cessàries en el moment corresponent als 4 períodes embrionaris seleccionats. Així com també per tenir una orientació sobre el possible dia del part i obtenir els individus corresponents als

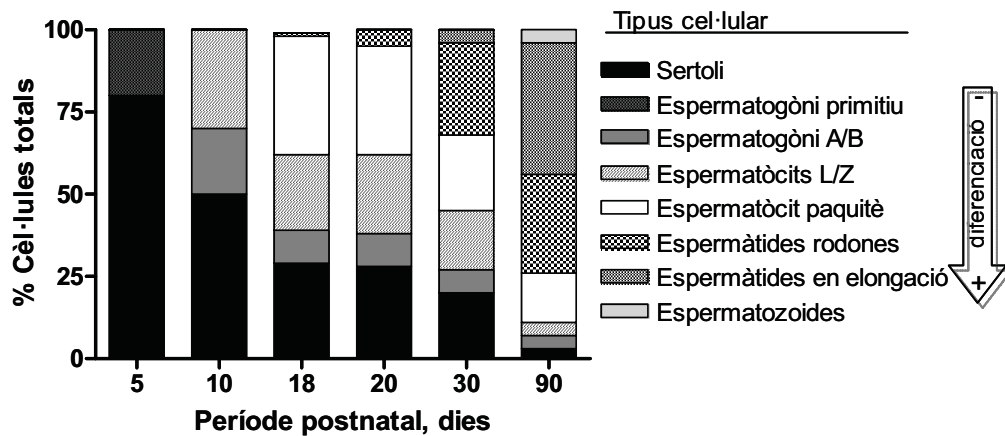
primers períodes postnats. Els animals utilitzats per les edats de 20, 30 i 90 dies postpart van ser encarregats al suministrador habitual de l'estabulari.



**FIGURA 1.12. Estudi de l'expressió dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* durant el desenvolupament del testicle de rata.** A) Disseny experimental dels estudis per analitzar l'expressió dels isoenzims uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) durant el desenvolupament testicular a la rata. B) Fotografies d'individus representatius de quatre edats estudiades (19-20 dies de gestació, menys de 4 hores de vida, 10 i 90 dies postpart). C) Taula on es resumeix per a cada període d'estudi el nombre de mares emprades, el nombre total de cries que es van obtenir i la proporció de mascles i femelles en la descendència total. Per a les edats majors de 20 dies, es van comprar directament els animals. (En els valors que porten \* s'ha estimat al 50% el percentatge de mascles i femelles de la camada).

Abans de plantejar-nos una hipòtesi que ens permetés explicar la presència d'expressió dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* al testicle en desenvolupament, primer calia tenir present una sèrie de consideracions. Així, cal destacar que en els mamífers, durant l'última part de la vida fetal les cèl·lules de Sertoli proliferen activament. Comencen a dividir-se a partir del dia 18 de gestació fins el moment del part (Levine et al, 2000). Pel que fa a les cèl·lules germinals, els espermatogonis primitius es mantenen en repòs durant tot el procés de gestació. Després del part l'epiteli seminífer roman estable, sense variacions en la seva composició fins els 6 dies postpart. En aquest moment les cèl·lules de Sertoli tornen a proliferar fins aturar-se al voltant del dia 20 postpart (Hess et al., 2006). També a partir d'aquest moment i tal i com es mostra a la Figura 1.13, els espermatogonis primitius comencen a dividir-se per formar nous espermatogonis (tipus A/B). Uns repoblaran l'epiteli (A) mentre els altres continuaran dividint-se (B) per donar els espermatòcits i continuar amb el procés de l'espermatogènesi. Al dia 10 postpart ja es troben espermatòcits leptotens i zigotens. Al dia 18 postpart hi ha un elevat percentatge d'espermatòcits paquitens i es comencen a detectar les primeres espermatides rodones, les quals assoleixen un alt nombre cel·lular als 30 dies postpart, que coincideix

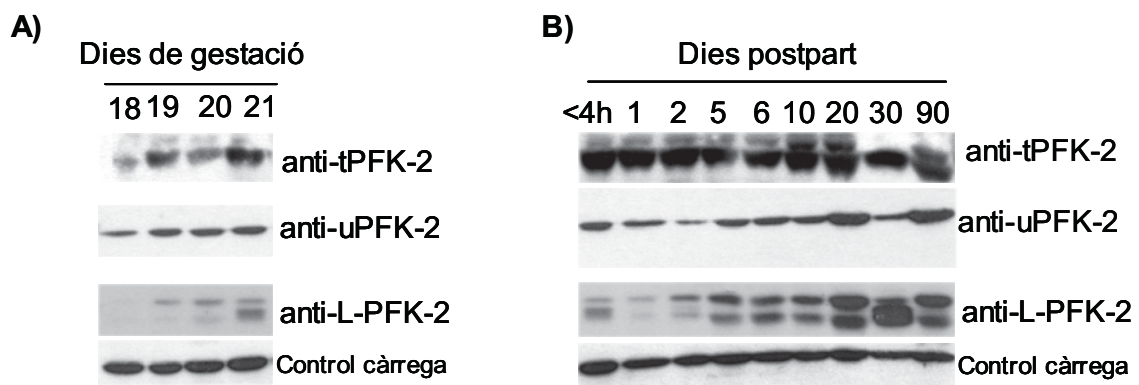
amb l'aparició de les primeres espermatides en elongació. Als 90 dies postpart, el testicle ja és adult i a l'epiteli seminífer s'hi troben tots els tipus cel·lulars germinals, fins i tots els espermatozoides localitzats al lumen del túbul.



**FIGURA 1.13.** Esquema de l'aparició temporal de les cèl·lules germinals durant el desenvolupament del testicle de ratolí. S'expressa el percentatge de cèl·lules totals a l'epiteli seminífer de ratolí prepúber i adulta. El dia del naixement es considera com a dia 0 postnatal. Adaptat de Bellve et al., 1977a; Bellve et al., 1977b; Thomas et al., 1989.

En conclusió, durant aquest període de temps, el percentatge de cèl·lules de Sertoli s'ha anat reduint, del 75% que representaven al dia 6 postpart fins a menys del 5% al testicle adult, tal com es mostra a la Figura 1.13 (Bellve et al, 1977, Thomas et al, 1989). L'efecte és degut en gran part a que al començament de la pubertat les cèl·lules de Sertoli perden la capacitat proliferativa mentre que les cèl·lules espermatogèniques són altament proliferatives.

Tenint present les variacions en la composició cel·lular del testicle durant les diferents etapes del desenvolupament estudiades, es va analitzar l'expressió de les proteïnes tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3).



**FIGURA 1.14.** Expressió dels isoenzims tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3) durant el desenvolupament del testicle de ratolí. A) Western blot de l'expressió dels isoenzims de la PFK-2 al testicle de ratolí en quatre estadis del període embrionari. B) Western blot de l'expressió dels isoenzims de la PFK-2 al testicle de ratolí durant la maduració de l'òrgan. Es van carregar 40 µg d'extracte proteic total.

A la Figura 1.14A es mostra un Western blot corresponent a l'anàlisi del període embrionari. Els resultats durant aquest temps mostraven que tant tPFK-2 (PFKFB4) com uPFK-2 (PFKFB3) es detectaven en els quatre períodes embrionaris estudiats. Ambdós ja es poden detectar al dia 18 de gestació i les seves expressions anaven incrementant a mida que s'aproximava el part i coincidint amb la fase de proliferació de les cèl·lules de Sertoli.

En l'anàlisi postnatal, tal com es pot observar a la Figura 1.14B, es va trobar que la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) era present a totes les edats estudiades mostrant dues bandes que es corresponien aproximadament a 50 i 55 kDa. La de 50 kDa no variava al llarg del temps, en canvi l'expressió de la proteïna de 55 kDa s'incrementava amb el temps, presentant més expressió a les edats corresponents a 10 i 20 dies postpart. Curiosament, en aquests dies postpart es produeixen les divisions de les cèl·lules germinals. Als 30 dies postpart, la banda superior desapareixia, i tornava a aparèixer a l'edat adulta. Aquest patró característic d'expressió es va comprovar que es repetia quan es va utilitzar l'anticòs anti-L-PFK-2. La proteïna uPFK-2 (PFKFB3) era present durant tot el període postnatal estudiat, observant-se que la seva expressió va incrementant d'acord amb la maduració de l'òrgan. Al dia 30 es produïa una disminució en la seva expressió que incrementava, un altre cop, a l'edat adulta.

Els resultats obtinguts a nivell de proteïna serien fàcilment explicables pels canvis que va experimentant el testicle en la seva composició cel·lular durant aquest període, si ambdós proteïnes es localitzessin a tipus cel·lulars diferents.

En paral·lel a l'anàlisi d'expressió de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) durant el desenvolupament del testicle, es va realitzar una anàlisi per PCR a temps real en els mateixos períodes de desenvolupament. Es van usar les sondes Rn\_00589179\_m1 i Rn\_00570987\_m1, corresponents als gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4*, respectivament, d'*Applied Biosystems*. A la Figura 1.15 es presenta la relació dels Cts obtinguts per a cada edat estudiada i per a cada sonda utilitzada en l'estudi de l'expressió dels gens *Pfkfb4* i *Pfkfb3* durant el desenvolupament del testicle de rata.

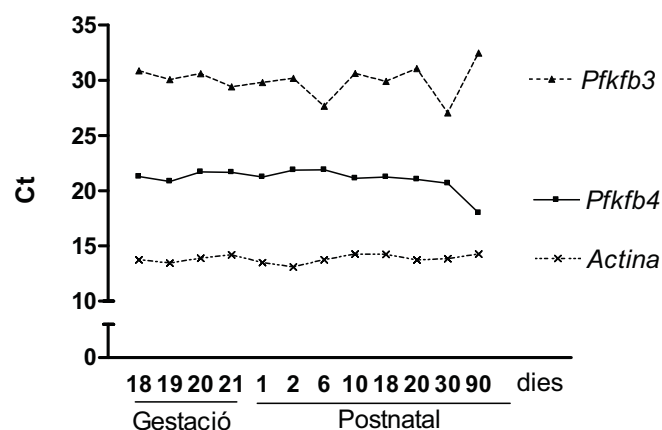


FIGURA 1.15. Relació dels Ct obtinguts per a cada edat estudiada i per a cada sonda utilitzada en l'estudi dels gens *Pfkfb4* i *Pfkfb3* durant el desenvolupament del testicle de rata.

Degut a la relació inversa que existeix entre el valor de Ct i l'expressió gènica (a menor Ct és major l'expressió del gen) es dedueix que el gen *Pfkfb4* seria el més abundant al llarg del desenvolupament del testicle de rata, ja que es detectava en qualsevol mostra entre els cicles 20 i 25 amb una única variació a la mostra de 90 dies on apareixia al Ct 18. En canvi, el gen *Pfkfb3* es detectava a totes les mostres entre els cicles 30 i 35 amb dos variacions, una a la mostra corresponent al dia 6 i la segona a la mostra corresponent al dia 30, on en tots dos casos apareixia al Ct 27. Tanmateix, es pot observar que el gen de l'*Actina*, que s'utilitzava com a normalitzador, tenia mínimes variacions al llarg del temps d'estudi.

En concordància amb que un menor Ct significa major quantitat d'mRNA es va assignar a aquest punt el valor del 100%, essent la mostra de 90 dies en el cas del gen *Pfkfb4* i la mostra de 30 dies pel gen *Pfkfb3*.

A la Figura 1.16A es mostren els resultats en percentatge d'mRNA del gen *Pfkfb4* corregits pels valors d'actina. El màxim d'expressió, considerat com el 100%, es donava en l'edat adulta (90 dies) mentre que a la resta d'edats es mantenia pràcticament constant, amb un baix nivell d'expressió entre el 5 i el 10%. Tot i no ser significatives s'observen lleugeres variacions a dia 19 de gestació i als dies 10, 18, 20 i 30 postpart

A la Figura 1.16B es mostren els resultats en percentatge de mRNA del gen *Pfkfb3* corregits pels valors d'actina. El màxim d'expressió, considerat com el 100%, es donava als 30 dies postpart, mentre que a la resta d'edats es mantenia al voltant del 10%. S'observen tres variacions: a dia 21 de gestació i als dies 6 i 18 postpart.

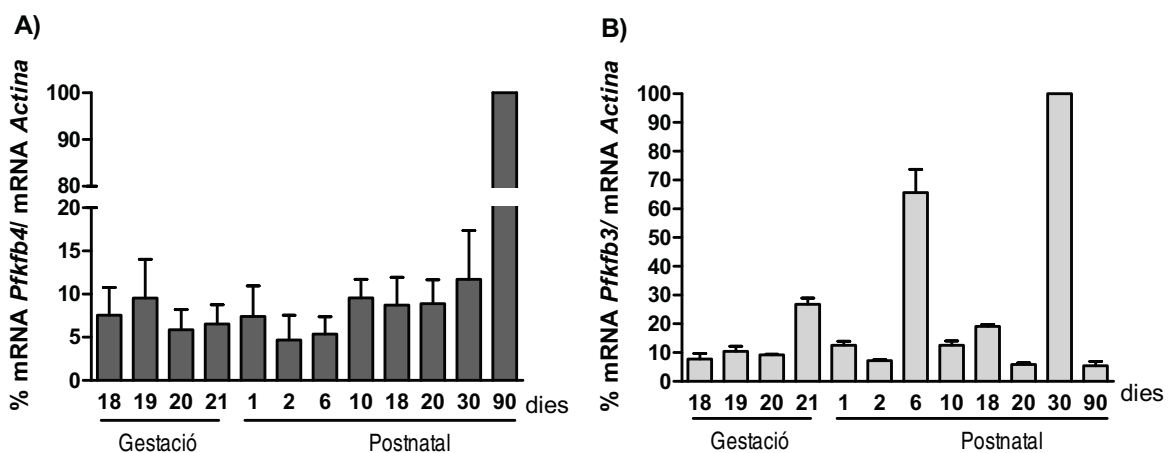


FIGURA 1.16. Anàlisi de l'mRNA dels gens *Pfkfb4* (A) i *Pfkfb3* (B) durant el desenvolupament del testicle de rata per RT-PCR.

A la Figura 1.17 es representen les gràfiques de les expressions dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* juntament amb la gràfica de l'aparició de les cèl·lules espermàtiques al llarg del temps. Els diferents pics d'mRNA es podrien relacionar amb canvis en la composició cel·lular del testicle degut a l'aparició

dels diferents tipus de cèl·lules germinals. Als 6 dies postpart coincidint amb l'inici de la proliferació dels espermatogonis primitius, hi hauria un pic d'mRNA que seria degut a un augment en l'expressió del gen *Pfkfb3*. Durant els dies 10, 18 i 20 postpart coincidint amb l'augment en el nombre de cèl·lules germinals hi hauria un lleuger augment d'expressió del gen *Pfkfb4* que seria el més abundant. El dia 30 postpart, quan les espermàtides rodones estan proliferant coincidiria amb un pic d'expressió del gen *Pfkfb3*. Finalment, quan el testicle és madur i fa espermatozoides, als 90 dies postpart, l'expressió majoritària correspondria al gen *Pfkfb4* (pràcticament del 90%) enfront el 10% del gen *Pfkfb3*.

Si es comparaven els resultats obtinguts de la PCR a temps real d'ambdós gens, s'observava que l'mRNA del gen *Pfkfb4* seria present amb major quantitat respecte l'mRNA del gen *Pfkfb3*. Aquest últim només sobrepassava l'expressió del gen *Pfkfb4* als 6 i 30 dies postpart, coincidint amb els moments en que les ones proliferatives de les cèl·lules espermatogèniques són de major importància

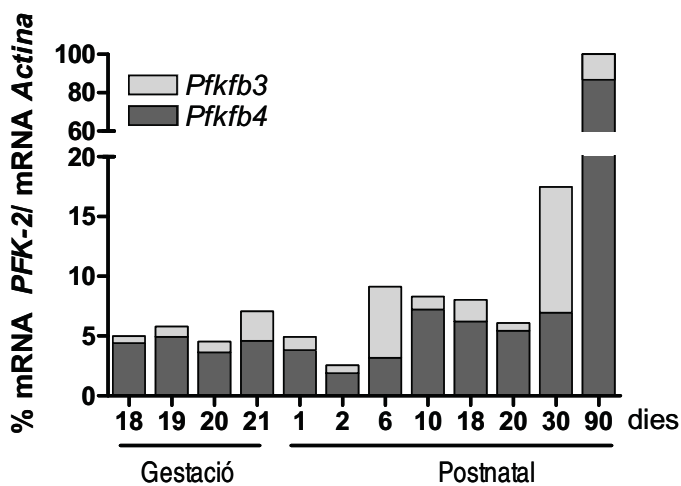
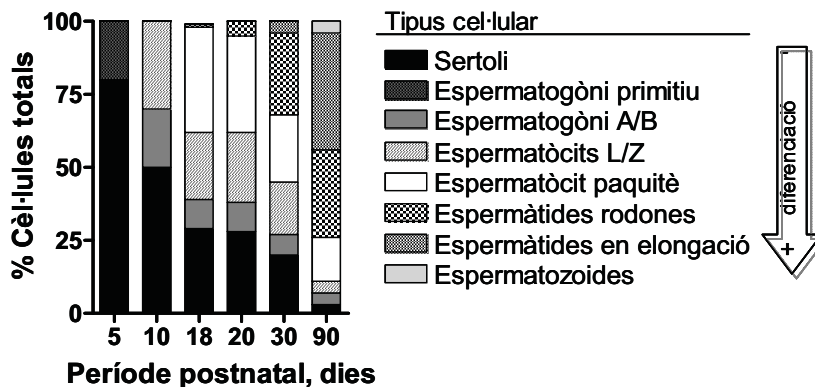


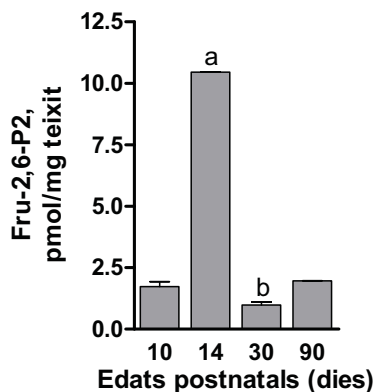
FIGURA 1.17. Comparativa de l'expressió gènica de *Pfkfb3* i *Pfkfb4* segons l'aparició seqüencial de les cèl·lules espermatiques al lumen dels túbuls seminífers.



Quan es consideren els resultats en conjunt, d'expressió de proteïna (Figura 1.14A i B) i d'expressió de mRNA (Figura 1.16A i B) aquests serien compatibles amb la hipòtesi que la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) podria localitzar-se a les cèl·lules de Sertoli i a les germinals en estat proliferatiu, mentre que la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) podria estar present només a les cèl·lules germinals, en especial quan aquestes estan diferenciant-se i produint els espermatozoides. Les diferències que es

troben per al gen *Pfkfb3* quan es comparen els nivells de proteïna (Figura 1.14) amb els nivells d'mRNA (Figura 1.16) es podrien explicar suposant un retard entre la transcripció i la traducció del gen *Pfkfb3*. Aquest és un mecanisme de regulació gènica àmpliament utilitzat per les cèl·lules espermatogèniques, com per exemple passa amb els gens codificants per les protamines 1 i 2 (*Prm 1* i *Prm 2*), que són mRNAs molt abundants i traduccionalment inerts en les espermàtides rodones (30 dies postpart) i actius a les espermàtides en elongació (90 dies postpart) (Kleene, 2003).

Per tal de poder disposar d'informació sobre els nivells d'activitat enzimàtica total en alguns dels períodes del desenvolupament estudiats es va determinar la concentració de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> en els dies 10, 14, 30 i 90 postpart. El resultat es representa a la Figura 1.18, on s'observa un pic en la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> al dia 14, mentre que als dies 10, 30 i 90 els nivells de Fru-2,6-P<sub>2</sub> són més baixos, essent significatiu a dia 30.



**FIGURA 1.18. Determinació de la concentració de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> durant la maduració postnatal del testicle de rata.** Les barres que porten a i b presenten diferències significatives ( $P < 0.001$ ) respecte les altres barres.

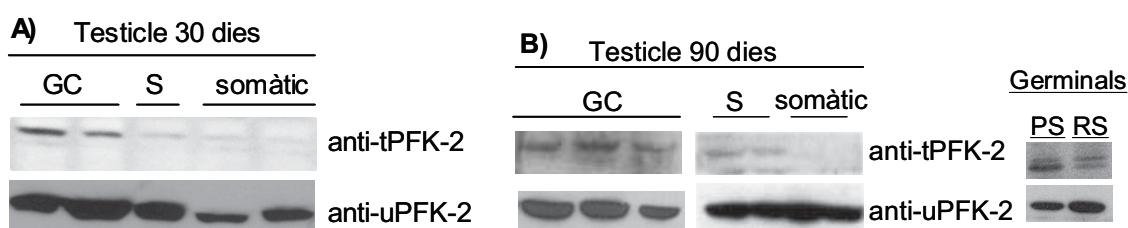
Cal tenir en compte que la concentració de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> que es va determinar era deguda a l'activitat PFK-2 total, és a dir, a la suma de la contribució de l'enzim uPFK-2 (PFKFB3) més la de l'enzim tPFK-2 (PFKFB4). El pic trobat a dia 14 podria explicar-se per l'alta taxa proliferativa per part de les cèl·lules germinals en aquesta edat, i coincidiria amb un augment de proteïna (veure la Figura 1.14) PFK-2 total (tPFK-2 (PFKFB4) més uPFK-2 (PFKFB3)) en comparar dia 10 amb dia 20. De fet la presència de l'enzim uPFK-2 (PFKFB3) en sistemes proliferants s'ha descrit com a clau per mantenir la glucòlisi activada (Calvo et al., 2006). Alhora la davallada significativa de concentració de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> observada als 30 dies també coincidiria amb una disminució de la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) (veure Figura 1.14B anti-uPFK-2 a dia 30).

## Estudi de l'expressió de PFKFB3 i PFKFB4 en les cèl·lules aïllades de testicle.

Els resultats anteriors suggerien que les proteïnes uPFK-2 (PFKFB 3) i tPFK-2 (PFKFB 4) es podrien localitzar a tipus cel·lulars diferents. Per tal de comprovar-ho es van aïllar les cèl·lules testiculars de rata als 30 i 90 dies postpart.

Als 30 dies postpart, les cèl·lules de Sertoli representen al voltant del 20% de les cèl·lules totals del testicle, i pel que fa als diferents tipus de cèl·lules germinals es troben representades des dels espermatogonis fins a les espermatides rodones (veure la Figura 1.13). Mitjançant el protocol de separació cel·lular dut a terme a partir de les cèl·lules testiculars d'un individu jove de 30 dies es van obtenir tres tipus de fraccions cel·lulars diferenciades. Fraccions enriquides amb els diferents tipus de cèl·lules germinals barrejades, fraccions enriquides amb cèl·lules de Sertoli però amb una petita contaminació de germinals, i fraccions enriquides de cèl·lules somàtiques (Leydig, peritubulars i Sertoli).

Com es pot veure a la Figura 1.19 A amb l'anàlisi de Western blot, la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) es va detectar principalment a les cèl·lules germinals, i en molt poca quantitat a la fracció de cèl·lules de Sertoli corresponent, possiblement, a una lleugera contaminació d'aquesta fracció amb cèl·lules germinals. tPFK-2 (PFKFB4) no es va detectar a la fracció de cèl·lules somàtiques. La proteïna uPFK-2 (PFKFB3) es detectava tant a les fraccions de cèl·lules germinals com a les somàtiques.



**FIGURA 1.19. Localització de les proteïnes tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3) a les cèl·lules testiculars aïllades.** (A) Western blot de cèl·lules testiculars aïllades a partir dels testicles de cinc animals prepúber de 30 dies. (B) Western blot de cèl·lules testiculars aïllades a partir dels testicles de tres animals adults de 90 dies. Es van carregar 40 µg d'extracte proteic total.

Als 90 dies postpart, les cèl·lules de Sertoli només representen el 5 % de les cèl·lules totals del testicle. El 95% restant correspon a les cèl·lules germinals que hi són presents en tots els estadis de maduració: espermatogonis, espermatòcits, espermatides rodones, espermatides en elongació i espermatozoides (veure la Figura 1.13). Mitjançant el protocol de separació cel·lular dut a terme i a



partir de les cèl·lules testiculars d'un individu adult de 90 dies es van obtenir les següents fraccions cel·lulars: fraccions enriquides amb els diferents tipus de cèl·lules germinals barrejades, fraccions enriquides amb cèl·lules de Sertoli però amb una petita contaminació de germinals i fraccions enriquides de cèl·lules somàtiques (Leydig, peritubulars i Sertoli).

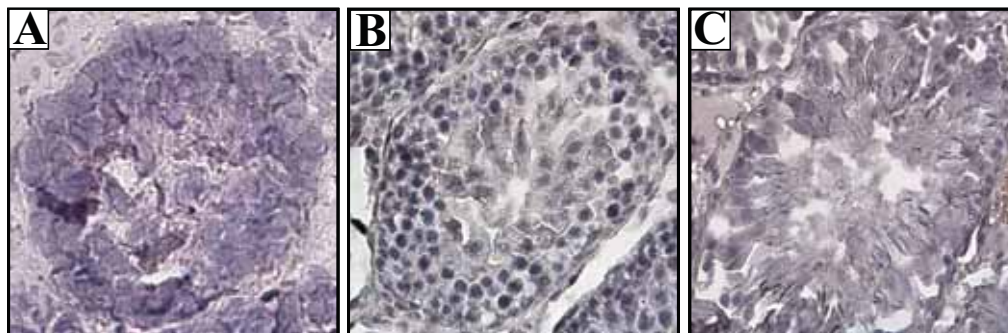
Com es pot veure a la Figura 1.19B amb l'anàlisi de Western blot, la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) es va detectar a les cèl·lules germinals i també, encara que a nivells baixos, a la fracció de cèl·lules de Sertoli, degut possiblement, a una contaminació d'aquesta amb les cèl·lules germinals, la fracció de cèl·lules somàtiques no tenia tPFK-2 (PFKFB4). La proteïna uPFK-2 (PFKFB3) es va detectar tant a les fraccions germinals com a les somàtiques.

Aquests resultats demostrarien que la proteïna uPFK-2 (PFKFB3), codificada pel gen *Pfkfb3*, es localitzaria en tots els tipus cel·lulars que formen el testicle, a les cèl·lules somàtiques i a les cèl·lules germinals. Refermant que es tractaria d'un isoenzim ubic present en els sistemes proliferants. Contràriament, la proteïna tPFK-2 (PFKFB4), identificada originalment a testicle, es localitzaria a les cèl·lules germinals, indicant que podria tenir un paper més rellevant en el metabolisme energètic que presenten les cèl·lules germinals en diferenciació.

### **Immunofluorescència durant el desenvolupament del testicle.**

Amb l'objectiu de determinar si es produeixen variacions en la localització de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) durant l'espermatogènesi, es va realitzar un estudi per immunofluorescència a partir de crioseccions de testicle de rata als 20, 30 i 90 dies postpart. Els teixits s'havien inclòs en un medi de congelació hidrosoluble anomenat OCT (Sakura-Finetek), que proporciona el medi ideal per incloure i tallar posteriorment els teixits amb un criostat a temperatures per sota de  $-10^{\circ}\text{C}$ , a més no deixa residus durant el processament de la mostra. Així mateix, per delimitar els marges dels túbuls i identificar els tipus cel·lulars presents a l'hora de fer la immunofluorescència, es van incubar els talls amb el producte TOPRO-III que s'uneix selectivament al DNA marcant els nuclis cel·lulars. Com a resultat es podien visualitzar els nuclis de color blau sota microscòpia confocal. Primerament però, per tal de veure l'estructura del teixit a estudi, es va realitzar una tinció amb hematoxilina de crioseccions transversals de testicle en les diferents edats de l'estudi (Figura 1.20).

Com mostren les seccions histològiques de la Figura 1.20, al teixit de 20 dies, l'epiteli encara no està estructurat i majoritàriament hi ha cèl·lules de Sertoli, espermatogonis i espermatòcits que es distribueixen entre les cèl·lules de Sertoli. En aquesta edat els túbuls són cecs.



**FIGURA 1.20. Seccions histològiques de testicle de rata a diferents edats.** Teixits inclosos en Tissue-Tek OCT (Sakura-Finetek), talls transversals de 6  $\mu\text{m}$  fets amb criostat. Tinció amb Hematoxilina, 400 augments. (A) 20 dies postpart: cèl·lules de Sertoli, espermatogonis i espermatòcits. (B) 30 dies postpart: cèl·lules de Sertoli, espermatogonis, espermatòcits i espermatòcits rodons. (C) 90 dies postpart: cèl·lules de Sertoli, espermatogonis, espermatòcits, espermatòcits rodons i en elongació.

Als 30 dies, l'epiteli ja està més estructurat, es poden distingir les cèl·lules de Sertoli (que ja han format la barrera hemato-testicular) i diferents tipus de cèl·lules germinals: espermatogonis a la zona basal dels túbuls, espermatòcits, espermatòcits rodons i algunes en elongació es situen en els espais que hi ha entre les cèl·lules de Sertoli. En aquesta edat els túbuls ja tenen lumen. Als 90 dies, quan l'individu és adult i els processos d'espermatogènesi i espermiogènesi es realitzen de forma contínua, l'epiteli seminífer està format per les cèl·lules de Sertoli i totes les cèl·lules germinals s'hi troben representades i s'intercalen entre les cèl·lules de Sertoli. A la zona basal dels túbuls es localitzen els espermatogonis i a la zona apical (al lumen tubular) es localitzen els espermatozoides. Entre aquests dos tipus cèl·lulars es distribueixen la resta de cèl·lules germinals.

Com es mostra a la Figura 1.21, en realitzar una immunolocalització de la proteïna uPFK-2 (PFKFB 3) mitjançant fluorescència es podia observar que als 20 i als 30 dies es localitzava al citoplasma de les cèl·lules de Sertoli i a les cèl·lules germinals en divisió. Als 90 dies, la fluorescència per l'isoenzim uPFK-2 (PFKFB3) es localitzava a tot l'epiteli. Aquest resultat ens estaria indicant que es tractaria d'una proteïna d'expressió característica de les cèl·lules de Sertoli i de les cèl·lules germinals en divisió.

FIGURA 1.21. Immunolocalització de la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) durant el desenvolupament del testicle a 20, 30 i 90 dies. Com a control negatiu es va ometre la incubació amb l'anticòs primari. Els talls s'han incubat amb el producte TOPRO-III que s'intercala al DNA marcant els nuclis de color blau.

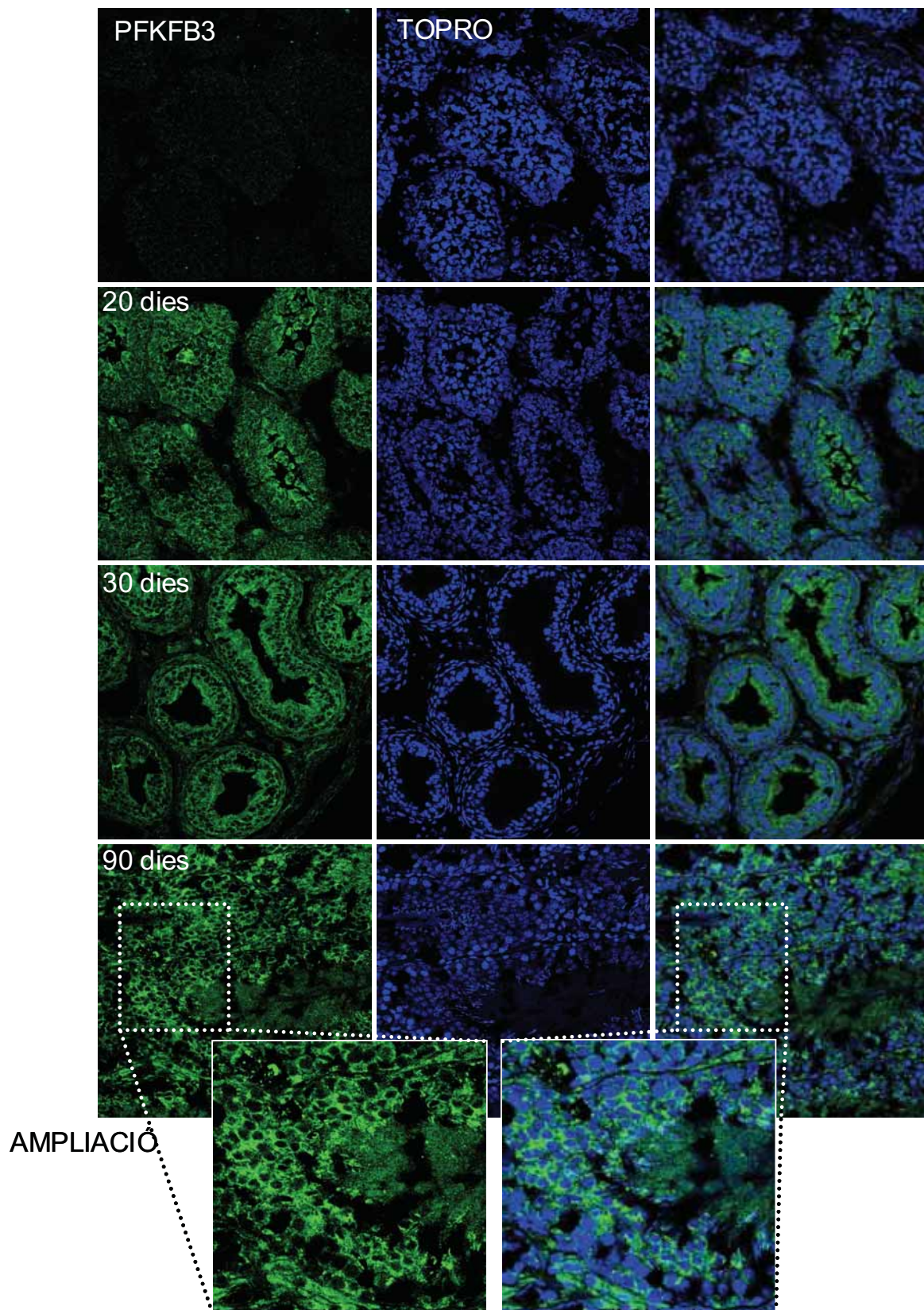
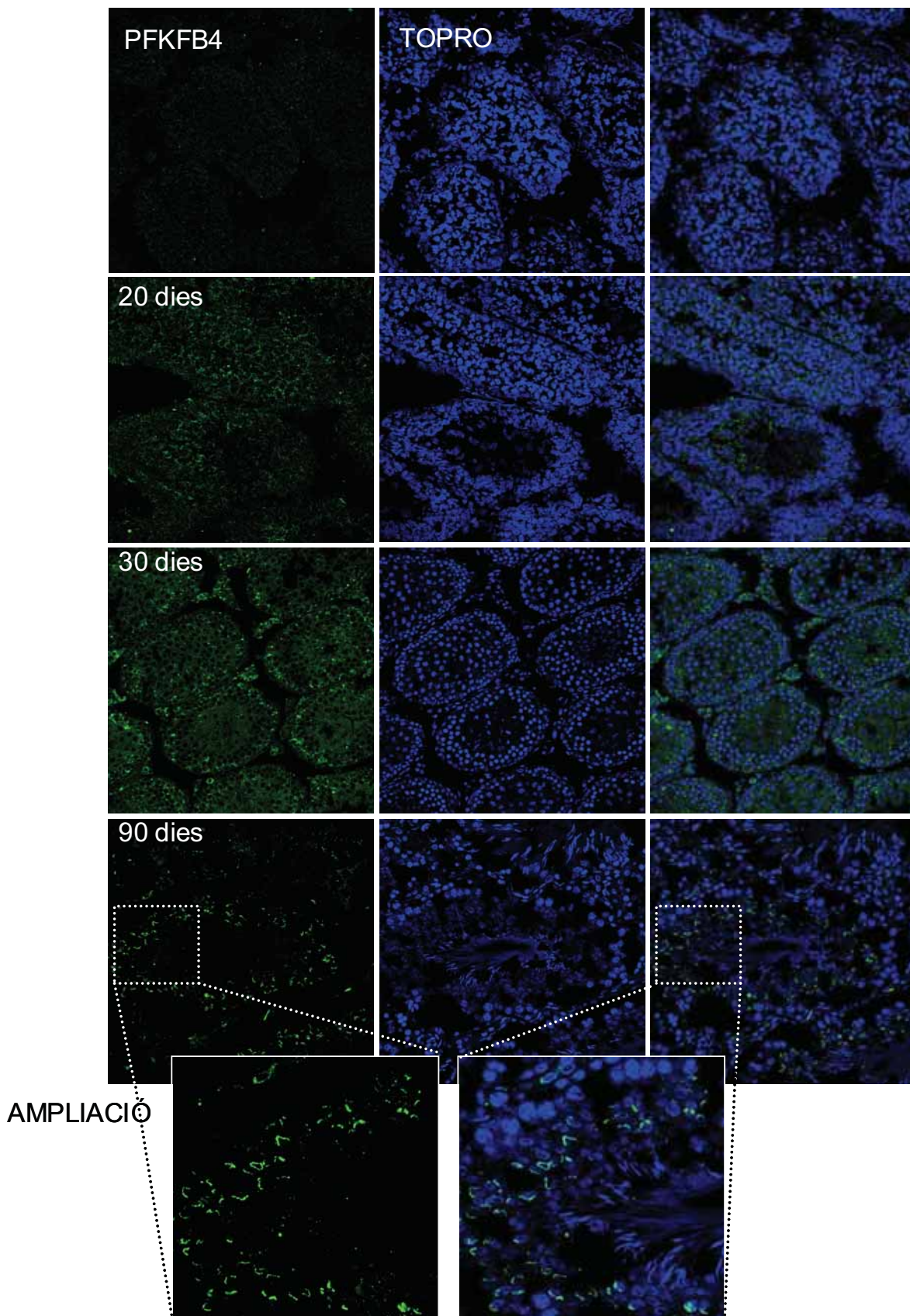


FIGURA 1.22. Immunolocalització de la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) durant el desenvolupament del testicle a 20, 30 i 90 dies. Com a control negatiu es va ometre la incubació amb l'anticòs primari. Els talls s'han incubat amb el producte TOPRO-III que s'intercala al DNA marcant els nuclis de color blau.

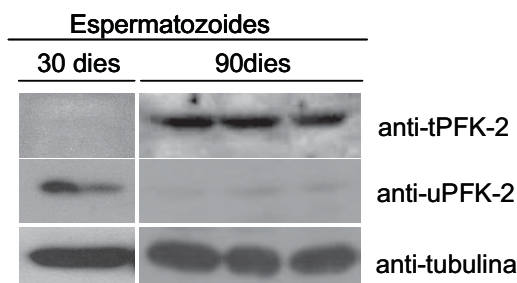


Com es mostra a la Figura 1.22, en realitzar la immunolocalització de tPFK-2 (PFKFB4) mitjançant fluorescència es podia observar que als 20 i als 30 dies es localitzava al citoplasma de les cèl·lules germinals, i s'observava que la quantitat de proteïna s'incrementava a mida que augmentaven els dies de desenvolupament, i apareixien les espermatides. Als 90 dies, la fluorescència per l'isoenzim tPFK-2 (PFKFB4) es localitzava a les cèl·lules germinals, en especial a les espermatides en elongació, on presentava la típica distribució en forma de mitja lluna característica del cap dels espermatozoides de rata.

Els resultats obtinguts indicarien que la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) s'expressaria a les cèl·lules somàtiques que estructuren els túbuls, a les cèl·lules germinals pre-meiotiques, que són les menys diferenciades i més proliferatives, i a les espermatides rodones haploides. En canvi, la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) només es localitzaria a les cèl·lules germinals i la seva expressió s'aniria incrementant en correlació amb l'aparició de cada nou tipus cel·lular. En estudiar la seva distribució a l'epiteli adult, s'observava que és present en major proporció a les cèl·lules germinals més diferenciades: les espermatides rodones i en elongació.

### Estudi de l'expressió de PFKFB3 i PFKFB4 als espermatozoides.

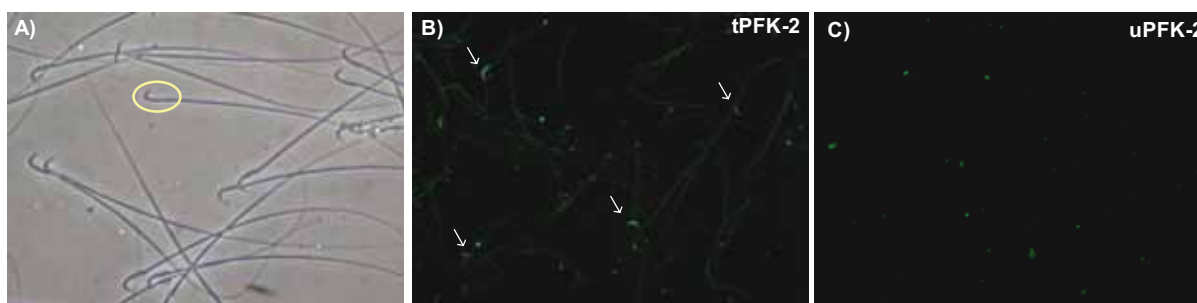
El següent pas va ser analitzar la distribució de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) durant la maduració dels espermatozoides de rata. Amb aquesta finalitat es van recollir els espermatozoides de l'epidídim als 90 dies (considerats com a espermatozoides madurs) i les espermatides en elongació d'animals de 30 dies (considerades com a espermatozoides immadurs) i es va analitzar la presència d'ambdues proteïnes amb un Western blot (Figura 1.23).



**FIGURA 1. 23. Localització de les proteïnes tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3) als espermatozoides de rata.** Western blot d'espermatozoides aïllats de l'epidídim, a partir de testicles de cinc animals prepúber de 30 dies i de testicles de tres animals adults de 90 dies. Es van carregar 40 µg d'extracte proteic total.

Segons es mostra a la Figura 1.23 quan els espermatozoides encara han de madurar (30 dies), la proteïna majoritària és la uPFK-2 (PFKFB3), mentre que quan els espermatozoides ja són madurs (90 dies), la proteïna majoritària és la tPFK-2 (PFKFB4). Aquest canvi d'isoenzims durant la maduració dels espermatozoides, fa pensar que la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) podria tenir un paper necessari en el metabolisme dels espermatozoides madurs i diferencial de la uPFK-2 (PFKFB3).

En els espermatozoides són nombrosos els enzims glucolítics específics del llinatge germinal. Aquests es localitzen a la part principal del flagel associats amb el citoesquelet (veure taula 2 de la introducció) (Eddy et al., 2003; Krisfalusi et al., 2006). Per tal de comprovar si la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) també es troba associada al citoesquelet, es va fer un estudi d'immunofluorescència en espermatozoides recollits de l'epidídim de rata adulta. També es va immunolocalitzar la proteïna uPFK-2 (PFKFB3). A la Figura 1.24A, es pot observar una imatge en camp clar on es veu la típica morfologia d'aquests espermatozoides amb el cap en forma de ganxo. Les imatges d'immunofluorescència resultants, mostraven clarament l'expressió de l'enzim tPFK-2 (PFKFB4) de manera principal a la zona del cap (Figura 1.24B) i en segon terme al flagel. Per l'enzim uPFK-2 (PFKFB3) no es va detectar la seva expressió en els espermatozoides madurs (Figura 1.24C), resultat que corroborava el que ja s'havia observat per Western.

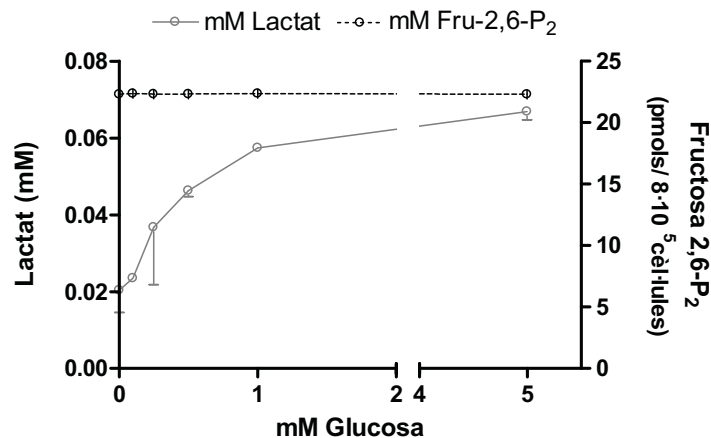


**FIGURA 1.24. Immunolocalització dels enzims tPFK-2 i uPFK-2 als espermatozoides de rata adulta.** A) Imatge en camp clar dels espermatozoides, s'ha encerclat un cap típic en forma de ganxo. B) Localització de la proteïna tPFK-2 (PFKFB4), les fletxes indiquen el cap dels espermatozoides lloc on s'hi troba la fluorescència. C) Localització negativa de la proteïna uPFK-2 (PFKFB3).

El grup del professor Hue, a l'any 1986, havia realitzat un estudi cultivant espermatozoides bovins amb concentracions creixents de glucosa, i duent a terme diverses determinacions per veure com aquesta glucosa es metabolitzava. Mesurant la concentració de lactat, van observar que com augmentava paral·lelament amb l'increment de la concentració de glucosa al medi. Contràriament, la concentració de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> es mantenia constant. Quan van canviar el substrat glucolític per fructosa enlloc de glucosa, els resultats que van obtenir van ser similars, sense variacions significatives en la concentració de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> en resposta a concentracions creixents de fructosa

en el medi de cultiu. Finalment també van provar d'inhibir amb  $\alpha$ -clorohidrina o 6-cloro-6-deoxiglucosa o activar amb cafeïna la producció de lactat. Aquestes substàncies són inhibidors i estimuladors de la glucòlisi als espermatozoides. Però en aquests experiments tampoc s'afectava la concentració de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub>. La manca de variacions en la concentració de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> en resposta a alguns dels seus reguladors descrits com són concentracions de glucosa creixents o presència d'insulina al medi es va explicar en aquell moment per la compartimentació, estructural i funcional, característica dels espermatozoides que dificultaria el trànsit de metabòlits (Philippe et al., 1986).

Donat que els nostres resultats semblaven indicar que als espermatozoides adults només estava present la proteïna tPFK-2 (PFKFB4), seria aquesta la responsable de regular la producció de Fructosa-2,6 P<sub>2</sub>. Seguint els resultats previs del grup del Dr. Hue, es va repetir l'experiment utilitzant, però, espermatozoides de rata de 90 dies. Aquests es van incubar amb concentracions creixents de glucosa durant 30 minuts. Tal com es pot observar a la Figura 1.25, a l'igual que l'experiment anteriorment descrit amb espermatozoides bovins (Philippe et al., 1986), en augmentar la concentració de glucosa del medi la concentració de lactat produït s'incrementava de forma dosi-depenent. Mentre que la concentració de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub>, que ja es detectava als espermatozoides en absència de glucosa, es mantenia constant al llarg de tot l'experiment.



**FIGURA 1.25.** Producció de lactat (gris) i contingut de Fru-2,6-P<sub>2</sub> (negre) d'espermatozoides de rata incubats amb glucosa. Els espermatozoides es van incubar amb diferents concentracions de glucosa durant 30 minuts a 37°C en agitació constant.

Aquests resultats realitzats amb els espermatozoides de rata, juntament amb els obtinguts amb els espermatozoides bovins (Philippe et al., 1986), indicarien que la regulació de l'activitat de la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) seria independent de la concentració de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> que es manté sense variacions tot i augmentar la taxa glucolítica.

## Expressió de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en tumors de testicle humà.

Existeix molta bibliografia que vincula la presència de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) a diferents línies tumorals en condicions de normòxia i d'hipòxia i en relació amb l'adquisició de l'anomenat fenotip glucolític (Atsumi et al., 2002; Bando et al., 2005; Chesney, 2006; Hamilton et al., 1997; Minchenko et al., 2004; Minchenko et al., 2005a; Minchenko et al., 2005c; Navarro-Sabate et al., 2001; Obach et al., 2004; Riera et al., 2002; Riera et al., 2003; Telang et al., 2006). Amb tot però, aquesta relació s'ha estudiat poc en els tumors de testicle derivats de les cèl·lules del llinatge germinal (TGCT).

Els tumors TGCT deriven de les cèl·lules germinals precursors que han aturat la seva maduració, fet que els comporta una diferenciació anormal (Figura 1.26).

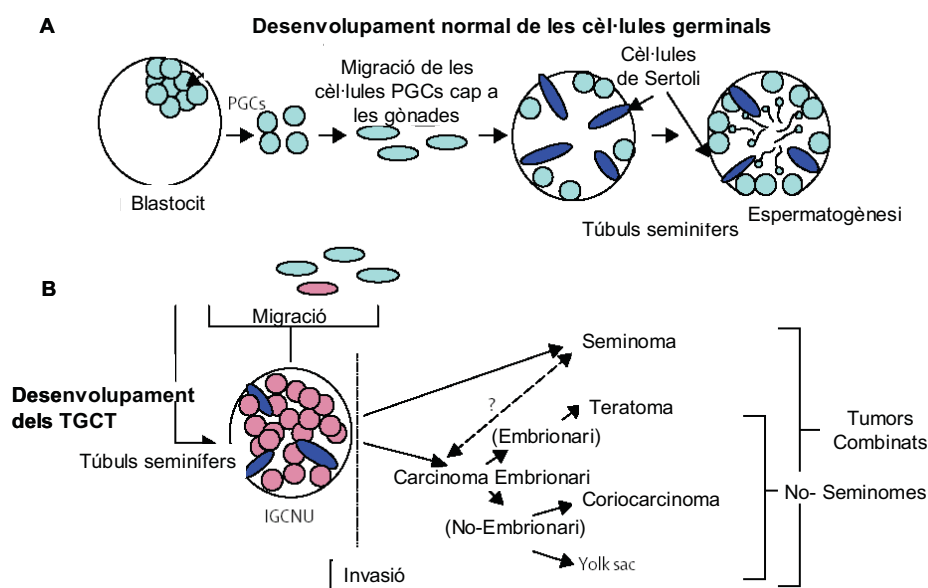


FIGURA 1.26. (A) Desenvolupament normal de les cèl·lules germinals. (B) Model de l'origen dels diferents subtipus de tumors TGCT (Horwich et al., 2006).

Aquests tumors s'inicien durant l'etapa fetal del desenvolupament de l'individu però solen manifestar-se a l'edat adulta. El procés de tumorigènesi implica canvis de les cèl·lules germinals precursors (PGC) durant la migració cap a la zona genital embrionària en desenvolupament o després que les cèl·lules hagin arribat a les gònades (Figura 1.26) (Horwich et al., 2006).

Histològicament, els TGCT s'han subdividit en dos grups; aquells tumors que estan formats per un únic tipus histològic i es corresponen amb els seminomes purs i aquells que estan formats per més d'un tipus i es coneixen amb el nom de no-seminomatosos. Aquesta classificació reflexa el seu



origen a partir de les cèl·lules germinals primordials i la seva capacitat de diferenciar *in vivo*. El segon grup es compon de tumors amb barreja de teratomes i carcinomes embrionaris i de teratomes i seminomes. De fet, més de la meitat dels tumors TGCT pertanyen al segon grup. Molts tumors no-seminomatosos poden estar formats per diferents tipus cel·lulars, combinant els tumors no-seminomatosos amb seminomes (Bosl and Motzer, 1997; Eble et al., 2004; Horwich et al., 2006).

Tumors seminomatosos purs	Tumors no-seminomatosos
Seminoma	Carcinoma embrionari Teratocarcinoma Coriocarcinoma Yolk Sac (tumor del sac vitel·lí) Carcinoma embrionari + seminoma Teratocarcinoma + seminoma Coriocarcinoma + seminoma Teratoma + seminoma

TAULA 1.1. Distribució dels subtipus de tumors TGCT (d'acord amb la classificació de l'OMS).

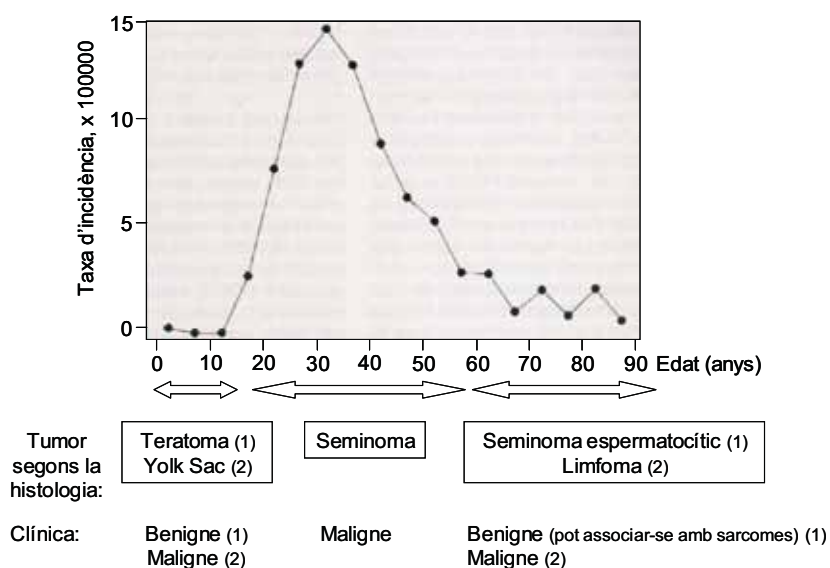
El seminoma és el tumor germinal de major incidència, prop del 50%. Està format per cèl·lules tumorals grans, d'elevada capacitat mitòtica (anaplasia), amb un nucli poc dens en cromatina i un nuclèol prominent. El citoplasma és clar i el límit cel·lular està poc definit, sol tenir infiltrats intersticials limfocitaris. El carcinoma embrionari es dona en un 25% dels tumors germinals. Està constituït per cèl·lules epitelials i mesenquimàtiques embrionàries immadures. Els teratomes corresponen al 8% dels tumors derivats de les cèl·lules germinals. Es componen d'elements derivats de l'endoderm, del mesoderm i de l'ectoderm. Segons l'edat de l'individu, es poden desenvolupar dos tipus de teratomes: teratomes madurs, que estan formats per teixits madurs i ben diferenciats, predominen en els lactants i nens i tenen un bon pronòstic. I els teratomes immadurs, que estan formats per elements més embrionaris i menys diferenciats, aquests predominen en els adults. El coriocarcinoma és el menys freqüent dels tumors germinals, representa només el 2% dels TGCT, però és el més agressiu i de pitjor pronòstic. Presenta metastasi precoç via sanguínia cap als pulmons. El Yolk sac o tumor del sac vitel·lí està format per cèl·lules germinals primitives que formen estructures glomeruloses o embrionaries.

El pronòstic d'aquests tumors TGCT empitjora segons l'ordre:

Teratoma > Seminoma > Carcinoma embrionari > Coriocarcinoma

Els TGCT, tot i iniciar-se a l'etapa fetal de formació del testicle es desenvolupen a l'edat adulta. De fet, l'edat del pacient és important per a determinar el tipus de tumor, tal com s'esquematitza a la Figura 1.27. Abans de la pubertat, de forma majoritària, es detecten *Yolk sac* i teratomes. Entre els 20 i els 50 anys es dona la major incidència de tumors de cèl·lules germinals; per

sobre dels 20 anys predominen els seminomes i en els pacients de més edat els seminomes espermatocítics i els limfomes malignes. En aquest últim rang d'edat, els tumors derivarien dels espermatogonis diferenciats i per tant, ja no tindrien un origen prenatal (Eble et al., 2004).



**FIGURA 1.27. Tumors de cèl·lules germinals (TGCT).** Incidència del càncer testicular en el sud-est d'Anglaterra (1995-1999). Classificació dels tres subgrups de TGCT segons l'edat d'aparició, la seva histologia i la prognosi. Adaptat d' Eble et al., 2004.

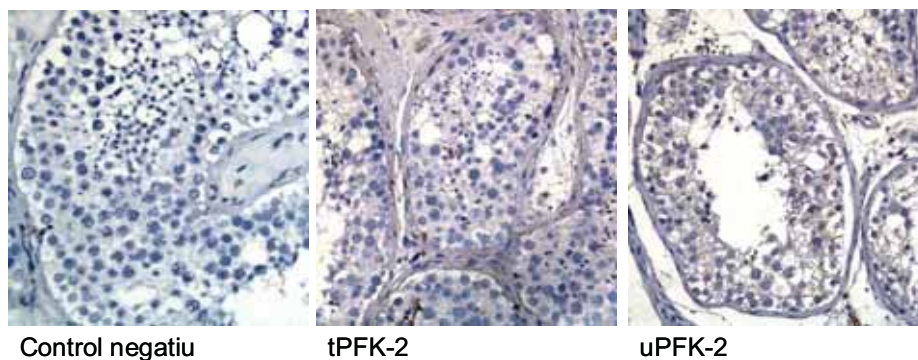
Els tumors TGCT afecten, preferentment, als homes caucàsics. La seva incidència varia segons l'àrea geogràfica, essent major a Escandinàvia, Alemanya i Nova Zelanda, d'incidència intermitja als Estats Units i amb una baixa incidència a l'Àsia i a l'Àfrica (Bosl and Motzer, 1997).

D'entre els factors importants de risc en l'home a tenir en compte per al possible desenvolupament dels tumors TGCT es troben: els factors prenatals (el baix pes i talla del neonat) que es relacionarien amb un retardament en el creixement intrauterí, la Criptorquídia – falta de migració testicular amb retenció dels testicles dins l'abdomen o el conducte inguinal- i l'esterilitat masculina. D'altra banda, la incidència d'aquest tipus de càncer s'ha duplicat en els darrers 40 anys, suggerint que hi podrien haver factors ambientals que també contribuïssin al desenvolupament. Malgrat que no existeixen evidències sòlides, s'ha especulat una possible implicació d'estrògens ambientals i de substàncies antiandrogèniques en l'increment de la incidència dels TGCT (Bosl and Motzer, 1997; Eble et al., 2004; Horwich et al., 2006).

Diferents marcadors sèrics ajuden al diagnòstic dels TGCT, n'hi ha dos de principals que es corresponen amb dos proteïnes d'origen embrionari que serveixen com a marcadors positius per al diagnòstic dels TGCT: la proteïna alfa fetoproteïna (AFP, de 70 kDa) i la subunitat beta de la proteïna gonadotropina coriònica ( $\beta$ hCG). Els seus nivells elevats a la sang dels pacients són indicatius de l'existència d'un tumor. Així doncs, l' $\beta$ hCG és produïda i secretada tant pels seminomes purs i pels

tumors no-seminomatosos i l'AFP és produïda pels tumors no-seminomatosos i no està present a la sang d'aquells pacients amb seminomes purs. Per tant, la presència elevada de les dues proteïnes (AFP i  $\beta$ hCG) és indicativa de tumors TGCT del tipus no seminomatosos, mentre que la presència elevada de  $\beta$ hCG i no de AFP és indicativa de tumors del tipus seminomatosos purs. Així mateix, l'enzim lactat deshidrogenasa-1 (LDH-1) també és un marcador tumoral de cèl·lules germinals, però menys específic que els anteriors. Pot trobar-se elevat en aquests malalts, s'ha demostrat l'existència d'una relació directa entre el grau d'increment de l'enzim i la massa del tumor (Eble et al., 2004; Horwich et al., 2006).

Amb els resultats obtinguts fins el moment, on semblaria que les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) s'estarien expressant en cèl·lules diferents del testicle, es va establir la hipòtesi que, en els tumors TGCT aquestes proteïnes podrien tenir també una expressió diferencial. Fins i tot es podria arribar a pensar que l'expressió de uPFK-2 (PFKFB3) i/o tPFK-2 (PFKFB4) presentés algun tipus de relació amb el grau de malignitat dels tumors TGCT. Com una primera aproximació, es va dur a terme un estudi immunohistoquímic detectant uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en seccions histològiques de testicles tumorals en col·laboració amb el Servei de Patologia de l'Hospital de Bellvitge. Primerament calia verificar en el model humà el patró d'expressió i la localització de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) que s'havia establert durant el desenvolupament testicular de rata (veure Figures 1.21 i 1.22). És a dir, expressió de uPFK-2 (PFKFB3) en Sertoli i cèl·lules germinals en divisió i expressió de tPFK-2 (PFKFB4) a cèl·lules germinals en diferenciació. Amb aquest objectiu i tal com es mostra a la Figura 1.28 es va analitzar per immunohistoquímica l'expressió i la localització de uPFK-2 i tPFK-2 a talls de biòpsies de testicle humà. Els resultats obtinguts mostraven que, en el model humà, els dos enzims seguien la mateixa distribució que la que havíem descrit al model de rata (veure Figures 1.21 i 1.22).



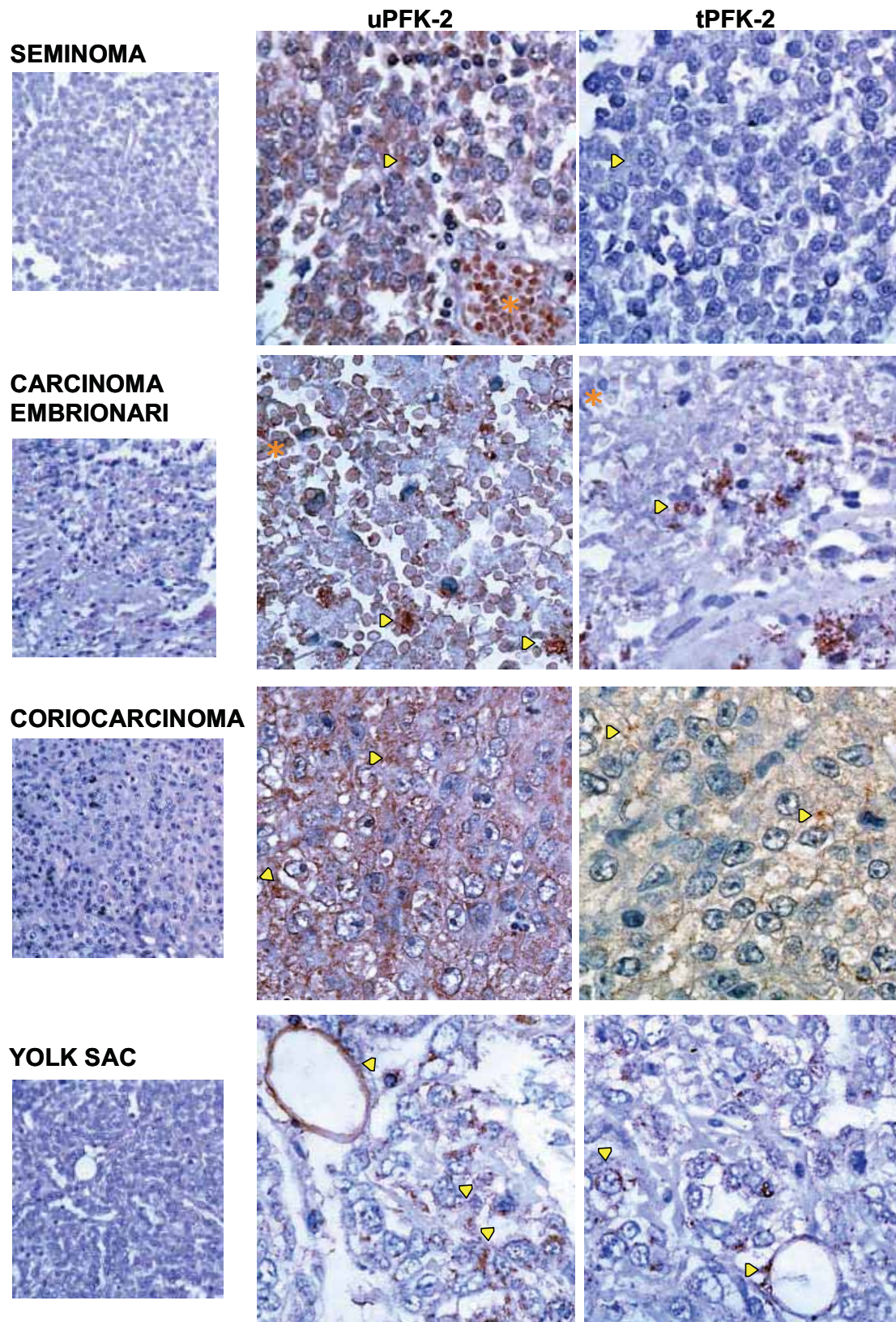
**FIGURA 1.28.** Immunolocalització de l'expressió dels enzims tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3) en talls de testicle humà. Com a control negatiu es va ometre l'incubació amb l'anticòs primari. Hematoxilina, 400x.

Seguidament es va iniciar una anàlisi preliminar d'àrees seleccionades de biòpsies de tumors disposades en un bloc de parafina en forma d'un *array* de teixits (TMA). Aquests tipus de seccions permeten fer una anàlisi ràpida i exhaustiva de múltiples mostres en un únic portaobjectes (Konoret et al, 19998; Schrawl et al, 1999). Els tipus de tumors on es va analitzar l'expressió de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) van ser: seminoma, carcinoma embrionari, coriocarcinoma, teratoma i tumors del sac vitel·lí (*Yolk Sac*) (Figura 1.29).

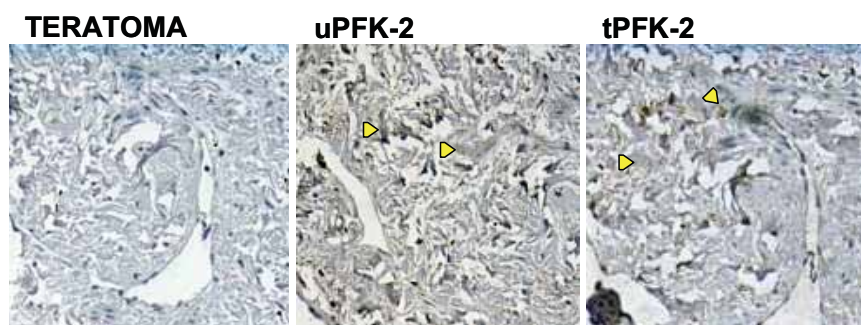
Segons es mostra a la Figura 1.29, exceptuant el cas del Seminoma, tant uPFK-2 (PFKFB3) com tPFK-2 (PFKFB4) es van trobar presents en els tumors amb diferent intensitat o concentració. uPFK-2 estava molt més expressada o representada en tots els tumors estudiats (seminoma, carcinoma embrionari, coriocarcinoma i *Yolk Sac*). Es tracta de tumors resultants del desenvolupament anormal de cèl·lules pluripotents: cèl·lules germinals i les cèl·lules embrionàries, són poc diferenciades, d'aparença epitelial i molt proliferants.

Encara que uPFK-2 (PFKFB3) sempre es trobava més representada que tPFK-2 (PFKFB4) en aquests tipus tumorals, en el cas del coriocarcinoma la proteïna tPFK-2 estava molt més expressada que en els altres tipus tumorals estudiats. El coriocarcinoma és el tumor TGCT més agressiu i amb pitjor pronòstic. L'expressió d'ambdós isoenzims li resultaria molt avantatjosa en l'adaptació al fenotip glucolític per poder créixer i metastatitzar. En el cas del teratoma no es van apreciar diferències d'expressió entre uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4). Tot i la poca expressió que manifesten estan distribuïts homogèniament en el teixit (Figura 1.30). Aquest tumor és el més diferenciat de tots els TGCT.

Segons els resultats d'expressió en aquests sistemes tumorals, la major expressió de uPFK-2 (PFKFB3) estaria associada a aquells sistemes molt proliferants i poc diferenciats. Confirmant una vegada més la relació entre el gen *Pfkfb3* amb el fenotip tumoral (Atsumi et al., 2002; Bando et al., 2005; Chesney, 2006; Hamilton et al., 1997; Minchenko et al., 2004; Minchenko et al., 2005a; Minchenko et al., 2005c; Navarro-Sabate et al., 2001; Obach et al., 2004; Riera et al., 2002; Riera et al., 2003; Telang et al., 2006). Els resultats presentats en aquest apartat són la descripció preliminar per continuar amb un estudi amb més detall de l'expressió de uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) amb l'objectiu de poder correlacionar de manera inequívoca l'expressió amb la malignitat del tumor.



**FIGURA 1.29.** Immunolocalització de uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en diferents tumors germinals. La punta de fletxa groga indica el marcatge positiu (excepte per tPFK-2 en el Seminoma), l'asterisc taronja assenyalava els eritròcits (positius per uPFK-2). Control negatiu a 100x (esquerra), uPFK-2 i tPFK-2 a 400x. Hematoxilina.



**FIGURA 1.30. Immunolocalització de uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en Teratoma.** La punta de fletxa groga indica el marcatge positiu. Control negatiu (esquerra), uPFK-2 i tPFK-2 a 100x. Hematoxilina.

Els resultats obtinguts al llarg d'aquest capítol, demostrarien que es produiria un canvi d'isoenzims de la PFK-2 durant els processos d'espermatogènesi i espermiogènesi. L'isoenzim ubic, uPFK-2 (PFKFB3), seria necessari durant les fases proliferatives, però un cop s'han format els espermatozoides madurs deixaria d'expressar-se. En canvi, l'isoenzim de testicle, tPFK-2 (PFKFB4), seria un enzim d'expressió específica a les cèl·lules espermatogèniques i als espermatozoides. Fet que suggeriria que aquest enzim podria jugar un paper clau en la producció d'energia necessària per la respiració, per la hiperactivació de la motilitat i per la fertilització.

## DISCUSSIÓ

Les cèl·lules germinals masculines són un bon exemple de tipus cel·lulars que oxiden glucosa fins a piruvat/lactat per obtenir energia. Tot i què la glucòlisi és un procés metabòlic conservat al llarg de l'evolució, hi ha alguns enzims de la via glucolítica que presenten variants d'isoenzims expressats específicament a les cèl·lules espermatogèniques com l'hexocinasa-1 (HK-1s) o la gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (GAPDS) (Mori et al., 1998; Mori et al., 1992) i fins i tot alguns són productes de gens només expressats al llinatge germinal, com seria l'aldolasa (BspA) (Broceno et al., 1995; Gillis and Tamblyn, 1984).

Pel que fa a la PFK-2/FBPasa-2, treballs anteriors realitzats en el nostre laboratori (Duran et al., 2008; Manzano et al., 1999; Riera, 2002) havien demostrat que en el testicle, tant humà i de rata, s'expressaven dos isoenzims de la proteïna PFK-2/FBPasa-2, uPFK-2 i tPFK-2, codificats per dos gens independents: *Pfkfb3* i *Pfkfb4*, respectivament. La presència de dos isoenzims dins un mateix teixit, fa pensar en l'existència d'una regulació metabòlica complexa, i què, ambdós isoenzims podrien

estar exercint funcions diferents en resposta per exemple a factors hormonals característics del teixit testicular.

Els resultats presentats en aquest capítol corroboren que l'expressió del gen *Pfkfb4* a la rata majoritàriament es donava a testicle, mentre que a la resta de teixits (cervell, epidídim, ronyó, fetge, melsa, cor, pulmó i placenta) ho feia en menor quantitat, sent només detectable per PCR a temps real (PCR-TR) i no per Northern blot. La tècnica de la PCR a temps real és molt més sensible que el Northern blot en detectar gens que s'expressen en baixa quantitat, fet que explicaria perquè fins ara no s'havia descrit l'expressió del gen *Pfkfb4* en condicions fisiològiques normals en altres teixits diferents del testicle. Tot i que a la bibliografia sí que s'havia descrit un augment en l'expressió de *Pfkfb4* en diverses línies tumorals (línies cel·lulars derivades de càncers hepàtics, gàstrics, de pròstata, mamàris i de cèrvix) sotmeses a la hipòxia (Minchenko et al., 2004; Minchenko et al., 2005a; Minchenko et al., 2005c).

Quan es comparaven per PCR a temps real les quantitats dels respectius mRNA a testicle adult de rata, clarament es detectava més quantitat de mRNA del gen *Pfkfb4* que de *Pfkfb3*. Aquest fet es podria explicar per una reducció o, fins i tot, una aturada en la transcripció del gen *Pfkfb3* en el testicle adult, ja que durant el procés espermatogènic està descrit que molts trànscrips es tradueixen poc o gens a proteïna (Kleene, 2001; Kleene, 2003). Es tractaria doncs, d'un mecanisme de control de la transcripció característic de l'espermatogènesi. Les Protamines: *Prm1* i *Prm2* són exemples de gens que es troben silenciats en alguna de les fases espermatogèniques. Així, *Prm1* i *Prm2* estan transcripcionalment reprimits a les espermatòides rodones però tornen a ser actius a les espermatòides en elongació (Kleene, 2003). Pel que fa als gens que codifiquen pels enzims glucolítics, el codificant per la fosfoglicerat cinasa-2 (*Pgk-2*) també es troba traduccionalment reprimat en els espermatòides en fase de paquitè i passa a ser traduït a les espermatòides rodones (Gold et al., 1983a; Gold et al., 1983b). Aquesta repressió gènica es produeix tant per l'acció de repressors que reconeixen específicament el mRNA o bé mitjançant repressors semiespecífics. A la bibliografia s'assumeix que la repressió traduccional de les protamines en les espermatòides rodones s'aconsegueix per accions de proteïnes específiques (per exemple la proteïna PRBP: *Protamine RNA-binding protein*) i d'elements cis en el seu promotor. Un exemple d'elements repressors de la traducció semiespecífics són les proteïnes Y-box, que aturen la traducció en els espermatòides en fase de paquitè i a les espermatòides rodones (Kleene, 2003). Degut a la condensació de la cromatina que té lloc durant l'espermiogènesi, els espermatozoides són transcripcionalment inerts, per aquesta raó moltes de les proteïnes presents als espermatozoides comencen a transcriure's a les espermatòides (Kleene, 2001). El conjunt dels mecanismes reguladors de la transcripció i de la traducció en les cèl·lules germinals té com a finalitat última la de proveir als espermatozoides dels mecanismes necessaris per promoure la fertilització

En aquest capítol s'ha descrit la presència de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en el testicle durant la seva formació i maduració des dels últims períodes gestacionals fins a la maduresa sexual de l'individu. En el període gestacional, les cèl·lules de Sertoli comencen a proliferar, ho fan des del dia 18 de gestació fins al naixement mentre que en el mateix període de temps, les cèl·lules germinals romanen quiescents. Durant aquesta etapa gestacional (del dia 18 prenatal fins al dia 21) per Western blot es va detectar la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) en forma de dues bandes, de 50 i 55 kDa, aproximadament. Mentre que la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) incrementava la seva expressió a mida que s'apropa el moment del part. A més, quan s'analitzaven els mRNAs de *Pfkfb4* i *Pfkfb3*, s'observava que l'expressió del gen *Pfkfb4* variava mínimament durant els últims estadis de gestació, contràriament, el nivell d'mRNA de *Pfkfb3* s'incrementava el dia previ al part.

Per a *Pfkfb3*, prèviament, el nostre laboratori havia fet un estudi similar durant el desenvolupament del cervell de rata (Goren et al., 2000). On es va observar que el gen *Pfkfb3* s'expressava des del període embrionari fins a l'edat adulta, amb un màxim el dia previ al naixement que s'acompanyava amb un increment en la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i en l'activitat PFK-2. Així doncs, el gen *Pfkfb3* a l'etapa prenatal mostraria un comportament similar moments abans del part en teixits tant distants com el testicle i el cervell de rata. També s'ha descrit un increment en els nivells de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> en fetges fetals prèviament al naixement per caure poc després, coincidint amb una hipoglucèmia neonatal (Hamer and Dickson, 1987; Schubert et al., 1983).

Com s'ha mostrat en aquest capítol, després del naixement el gen *Pfkfb4* mantenia una expressió constant fins a la pubertat de l'individu, seria una expressió equiparable a aquella que presentava en els últims dies de la gestació i en el moment del part. La composició cel·lular de l'epiteli seminífer durant aquesta etapa gairebé no varia fins arribar al sisè dia postpart que és quan les cèl·lules germinals immadures, o espermatogonis (2n) comencen a dividir-se. Les cèl·lules de Sertoli també comencen a dividir-se fins al dia 20. Algunes de les cèl·lules filles dels espermatogonis seguiran dividint-se constantment al llarg de la vida de l'individu, mentre que altres aturaran la proliferació i es diferenciaran a espermatòcits primaris (2n) que continuaran amb el procés espermatogènic. Coincidint amb l'inici de la proliferació dels espermatogonis i de les cèl·lules de Sertoli, a dia 6, el gen *Pfkfb3* presentava un pic d'expressió, i va ser al dia 30 postpart quan presentava el pic més alt d'expressió. Durant aquest període de temps, la composició cel·lular de l'epiteli es torna altament heterogènia; al dia 10 postpart, l'epiteli es compon d'espermatòcits leptotens i zigotens. Al dia 18, hi ha un gran nombre d'espermatòcits paquitens i es poden detectar les primeres espermàtides rodones (n), que assoleixen un elevat nombre als 30 dies postpart. A continuació, aquestes espermàtides haploides es diferencien morfològicament, formant les espermàtides en elongació que esdevindran els espermatozoides. Aquests són alliberats al lumen, on experimenten una maduració posterior, després



a l'epidídim, es tornen mòbils i esdevenen espermatozoides completament madurs. Als 90 dies postpart, quan el testicle ja és madur, a l'epiteli seminífer s'hi troben tots els tipus cel·lulars germinals, des dels espermatogonis a la zona basal, fins a espermatozoides al lumen del túbul (Bellve et al., 1977a; Bellve et al., 1977b; Thomas et al., 1989). Quan s'avalua l'expressió d'ambdós gens a l'edat adulta (90 dies), *Pfkfb4* tenia el màxim d'expressió, mentre que, l'expressió del gen *Pfkfb3* havia disminuït considerablement.

Clarament es podria corelacionar l'expressió del gen *Pfkfb3* amb les ones proliferatives que es produeixen en l'epiteli seminífer; tant de les cèl·lules de Sertoli (5-6 dies postpart) com de les cèl·lules germinals (30 dies postpart), que es representen a la Figura 1.31. Mentre que l'expressió del gen *Pfkfb4* estaria relacionada amb el procés de diferenciació de l'espermioènesi.

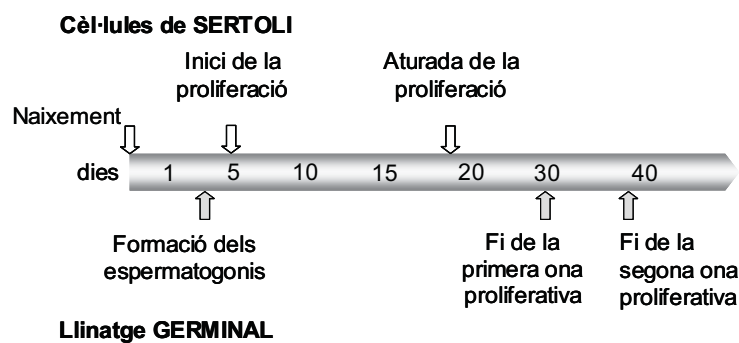


FIGURA 1.31. Representació temporal dels esdeveniments proliferatius, somàtics i germinals, de l'epiteli seminífer durant el període postnatal. Adaptat d'Hess et al., 2006.

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de l'expressió de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) i dels gens que les codifiquen al llarg de la maduració del testicle de rata estarien d'acord amb que tots dos gens/proteïnes es podrien expressar en tipus cel·lulars diferents. Els resultats més clars per verificar aquest punt van ser els obtinguts a partir dels estudis d'immunofluorescència de seccions de testicle a les edats de 20, 30 i 90 dies postpart, acompanyats de la verificació per Western blot de la presència de uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en cèl·lules testiculars aïllades. Tot plegat confirma que la proteïna uPFK-2 és present tant a les cèl·lules somàtiques com a les germinals, en especial a les cèl·lules premeiòtiques. Pel que fa a la proteïna tPFK-2, només es va trobar a les cèl·lules germinals en especial a les cèl·lules postmeiòtiques, les espermàtides en elongació, on seguia una distribució perinuclear.

Tanmateix, en mesurar la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> durant l'espermatoènesi, es va observar un pic al dia 14 postpart, moment en que l'epiteli és altament proliferatiu (Figura 1.31), mentre que al dia 30 postpart té la concentració més baixa, i curiosament això coincidiria amb una disminució en la quantitat de proteïna uPFK-2 (PFKFB3) (observada prèviament a la Figura 1.14B).

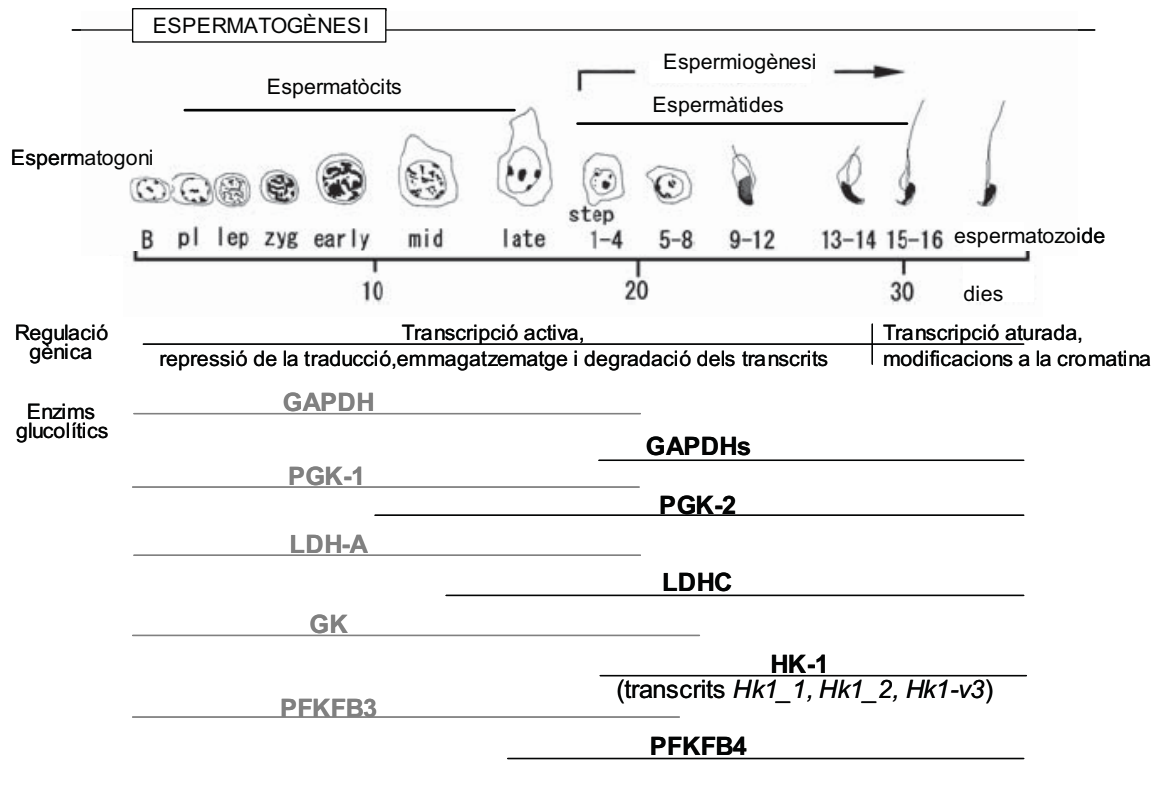
L'expressió d'uPFK-2 (PFKFB3) s'associa a aquells teixits d'elevada taxa proliferativa (el testicle, el timus i la melsa) així com a diferents línies tumorals (Atsumi et al., 2002; Bando et al., 2005; Chesney, 2006; Hamilton et al., 1997; Navarro-Sabate et al., 2001; Obach et al., 2004; Riera et al., 2002; Riera et al., 2003; Telang et al., 2006). Segons aquests resultats es tornaria a relacionar l'expressió d'aquesta proteïna amb els fenòmens de proliferació que tenen lloc al testicle. Donat que la uPFK-2 (PFKFB3) té la relació cinasa:fosfatasa més alta de tots els isoenzims de la PFK-2, es podria explicar per aquesta característica la seva relació d'expressió en els sistemes proliferants en general i en concret a les cèl·lules germinals proliferants.

Com ja s'ha esmentat anteriorment, un tret característic en l'espermatogènesi, és l'expressió d'enzims que són productes de gens que s'expressen específicament o predominantment a les cèl·lules espermatogèniques, sobretot a la fase postmeiòtica. Aquests enzims solen substituir als enzims del llinatge somàtic. Entre els gens específics del llinatge germinal es troben aquells que codifiquen per enzims glucolítics com per exemple; Gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa-s (*Gapdhs*) que s'ha trobat tant a rata, ratolí i humans (Welch et al., 2006; Welch et al., 2000; Welch et al., 1992), Fosfoglicerat cinasa-2 (*Pgk-2*) *murina*, humana i porcina (Bluthmann et al., 1982; Boer et al., 1987; Chen et al., 2004; McCarrey et al., 1996; McClard et al., 1986), Lactat deshidrogenasa-c (*Ldhc*) que s'ha trobat a rata, ratolí, humans (Li et al., 1998; Millan et al., 1987; Sakai et al., 1987) i Hexocinasa-1 (*Hk-1s*) (Nakamura et al., 2007; Nakamura et al., 2008). Els respectius gens als quals substitueixen serien: Gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (*Gapdh*), Fosfoglicerat cinasa-1 (*Pgk-1*), Lactat deshidrogenasa-A (*Ldha*) i Glucocinasa (*Gk*). Igualment es podria hipotetitzar que el gen *Pfkfb4* substituiria al gen *Pfkfb3* a les cèl·lules espermatogèniques postmeiòtiques, tal com s'esquematitza a la Figura 1.32.

---

**FIGURA 1.32. Diagrama temporal de l'espermatogènesi i l'espermiogènesi.** Es mostra una cèl·lula representativa de cada fase de l'espermatogènesi. Adaptat de (Tanaka and Baba, 2005). **La regulació de l'expressió gènica** durant aquest procés està controlada seqüencialment en el temps: a l'inici de la transcripció es troba activada però, progressivament, hi ha una repressió, que acaba en l'aturada de la transcripció que va associada amb modificacions a la cromatina. A sota es mostra la **distribució temporal** d'alguns **dels enzims glucolítics**; els que s'expressen tant a les cèl·lules somàtiques com a les germinals (en gris) es localitzen a les cèl·lules de la fase meiòtica. Mentre que els específics de testicle (en negre) s'expressen principalment durant la fase postmeiòtica de l'espermatogènesi. Essent aquests últims, els únics que es troben als espermatozoides madurs. (Bluthmann et al., 1982; Boer et al., 1987; Chen et al., 2004; Li et al., 1998; McCarrey et al., 1996; McClard et al., 1986; Millan et al., 1987; Sakai et al., 1987; Welch et al., 2006; Welch et al., 2000; Welch et al., 1992).

---



Són moltes les evidències experimentals que relacionen l'expressió de la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) amb teixits altament proliferants i amb tumors (Atsumi et al., 2002; Bando et al., 2005; Chesney, 2006; Riera et al., 2002). En el nostre laboratori es va demostrar que durant la diferenciació muscular a cèl·lules C2C12 (fibroblast de ratolí), l'expressió de la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) i del seu mRNA disminueix degut a la implicació del proteosoma en la seva degradació durant la miogènesi (Riera et al., 2003); sent l'isoenzim M-PFK-2 (PFKFB1) el majoritari en el múscul adult. Per tant, uPFK-2 (PFKFB3) estaria present en teixits proliferants no diferenciats, i quan el teixit es diferencia, la seva expressió s'aniria reduint mentre que s'incrementaria l'expressió d'un altre isoenzim de la PFK-2 específic del teixit, la proteïna M-PFK-2 a múscul. D'igual manera, recentment el nostre laboratori també ha publicat indicis que durant la formació i maduració del fetge i dels ronyons, la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) es troba expressada mentre els òrgans s'estan formant i, progressivament, disminueix en favor d'una nova isoforma anomenada K3, que és produïda per splicing alternatiu també pel mateix gen *Pfkfb3* (Duran et al., 2008).

Aquest mateix model seria plausible per explicar els nostres resultats, on en els estadis altament proliferatius l'expressió majoritària correspondria a uPFK-2 (PFKFB3) i aquesta aniria reduint mentre incrementa l'aparició de tPFK-2 (PFKFB4) a les cèl·lules germinals que van madurant fins esdevenir espermatozoides. Aquests resultats estan suportats pel fet que en analitzar l'expressió

d'ambdós isoenzims als espermatozoides aïllats de l'epidídim es va detectar la proteïna uPFK-2 als espermatozoides immadurs (d'un animal jove, 30 dies). En canvi, quan els espermatozoides són completament funcionals (a un animal adult, 90 dies) només es detecta la proteïna tPFK-2, localitzant-se a l'àrea de l'acrosoma principalment i en una proporció molt menor a la peça central del flagel.

Així mateix, s'ha presentat en aquest capítol un estudi preliminar de l'expressió de uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en biòpsies de tumors germinals humans. Es tracta de tumors provinents del desenvolupament anormal de cèl·lules pluripotents (germinals i embrionàries) poc diferenciades i molt proliferants. L'enzim majoritàriament expressat en aquests tipus tumorals de gran velocitat proliferativa va ser uPFK-2 (PFKFB3), mentre que tPFK-2 (PFKFB4) s'expressava de forma minoritària, fins i tot no va ser detectat en els tumors de tipus seminomes. Les cèl·lules tumorals, en ser molt proliferatives, tenen una elevada taxa glucolítica i produeixen lactat en gran quantitats fins i tot en presència d'oxigen (l'anomenat efecte Warburg (Warburg, 1930)). Degut a les seves característiques cinètiques, l'expressió de l'enzim uPFK-2 en aquests tipus tumorals resultaria molt favorable per tal d'aconseguir el fenotip glucolític que necessiten.

El conjunt de tots els resultats del capítol, confirmarien que l'enzim ubic uPFK-2 (PFKFB3) tindria importància en permetre la proliferació i l'adaptació al fenotip glucolític de les cèl·lules tumorals i/o proliferants, les quals són capaces de mantenir alts nivells de glucòlisi anaeròbica fins i tot en presència d'oxigen (Warburg, 1930; Warburg, 1956). Un cop les cèl·lules s'han diferenciat, la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) decauria en benefici d'un increment en l'expressió d'un altre isoenzim de la família de la PFK-2/FBPasa-2 que en el cas de l'espermatogènesi seria la proteïna tPFK-2 (PFKFB4).

---

**II.**

---

---

**CLONATGE, CARACTERITZACIÓ i REGULACIÓ DEL  
PROMOTOR DEL GEN *Pfkfb4***

---

L'objectiu principal a assolir en aquest segon capítol de resultats va ser el clonatge de la regió 5'- promotora del gen *Pfkfb4* i l'estudi de la seva regulació en resposta a diversos factors en un model cel·lular germinal.

Es va determinar l'inici de transcripció del gen *Pfkfb4*, els possibles elements consens de resposta a factors de transcripció i la regió mínima promotora responsable de conduir la transcripció basal. També es va estudiar la resposta promotora a diferents agents mitògens, com són el sèrum i els èsters de forbol.

D'altra banda, es va estudiar la resposta del promotor *Pfkfb4* a la hipòxia (HIF1) i als factors transcripcionals Sp1 i c-Myc, així com les possibles relacions que es podrien establir entre ells tant en situacions de normòxia com d'hipòxia.

## INTRODUCCIÓ

Fa uns anys, en el nostre laboratori es treballava en la caracterització d'un nou isoenzim de la PFK-2/FBPasa-2 característica de testicle. A partir d'una genoteca de testicle humà es va aconseguir clonar el seu cDNA sencer, així com una part de la seva regió 5'-flanquejant i la regió del primer intró (Manzano et al., 1999). Anteriorment, l'any 1991, Sakata i els seus col·laboradors ja havien descrit un cDNA de PFK-2 diferent als coneguts fins aquell moment i que va ser aïllat a partir d'una genoteca de testicle de rata (Sakata et al., 1991).

Mitjançant l'ús de programes informàtics (Tfsearch) es va efectuar una primera anàlisi de les seqüències 5'-flanquejant del gen *Pfkfb4* humà clonades en el nostre laboratori i es va poder identificar alguns possibles elements reguladors. A la zona 5'-flanquejant, s'hi van trobar putatives caixes TATA, seqüències d'unió als factors Sp1, AP-1 i seqüències de resposta a hormones, entre d'altres. També es van trobar algunes d'aquestes seqüències consens per diversos factors de transcripció a la zona del primer intró (Manzano, 1999).

Amb aquesta informació prèvia sobre els possibles elements reguladors del gen *Pfkfb4*, ens vam plantejar analitzar exhaustivament la seva regulació transcripcional. Per a dur a terme aquest estudi, primer es necessitava generar fragments de la seqüència 5'-UTR del gen i clonar-los dins un vector d'expressió luciferasa. Per tal d'abordar el clonatge de la regió 5'-del gen *Pfkfb4* es va partir de la seqüència del cosmid PAC PR5-1034C16 (GeneBank Acc. No. AY86551), que contenia el gen *Pfkfb4*.

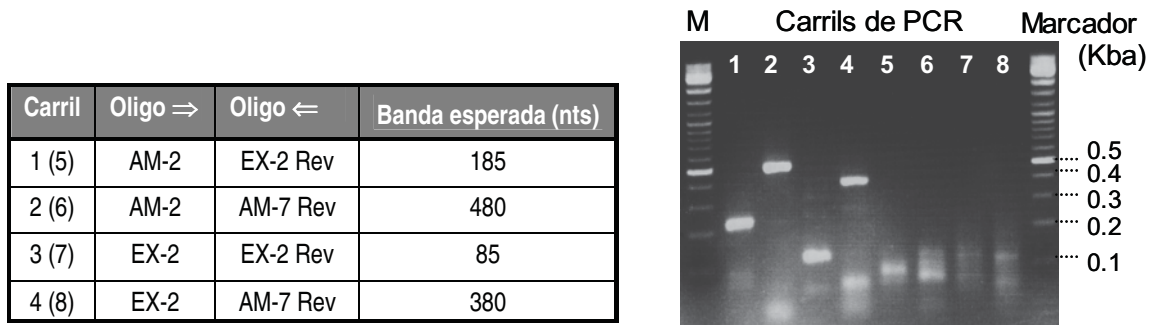
## RESULTATS

### Caracterització de l'inici de transcripció del gen *Pfkfb4* humà

La regió 5'-flanquejant del gen *Pfkfb4* està limitada a 7.4 kilobases compreses entre la fi del gen del *Col-lagen VII* i l'inici del primer exó del gen *Pfkfb4*. Aquesta seqüència estava clonada sencera en el PAC RP5-1034C16 (GeneBank Acc. No. AY86551).

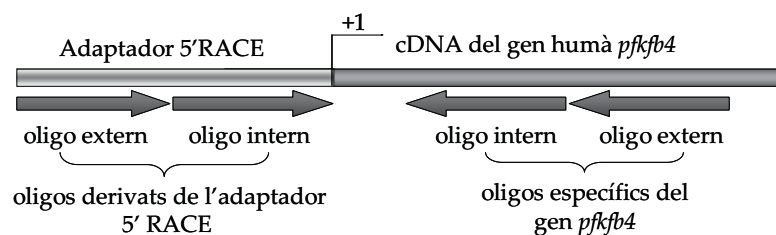
En primer lloc, es va determinar l'inici de transcripció del gen *Pfkfb4*. Amb aquesta finalitat, es va dissenyar una anàlisi de 5'-RACE a partir d'una població de cDNA de testicle humà comercial. Aquest cDNA prové d'amplificacions de mRNAs complets els quals presenten unit al seu extrem 5'-un oligonucleòtid adaptador (FirstChoice® RACE-Ready cDNA kit. Ambion). Per tal d'assegurar que el mRNA transcrit del gen *Pfkfb4* hi era representat, en primer lloc es va verificar la seva presència a la

població de cDNAs de testicle humà per PCR. A la següent taula es resumeixen els oligonucleòtids usats i la mida esperada de les bandes (Figura 2.1).



**FIGURA 2.1.** Verificació de la presència del cDNA del gen *Pfkfb4* humà en la població comercial de cDNAs de testicle humà (Ambion). A la taula de l'esquerra es resumeixen els oligonucleòtids usats a la PCR de verificació i la mida, en nucleòtids, dels fragments de PCR resultants. A la dreta hi ha el gel d'agarosa, al 2%, mostrant els DNAs de les PCR obtingudes. Els carrils 1, 2, 3 i 4 corresponen als controls positius i els carrils 5, 6, 7 i 8 són els respectius controls negatius, tal com s'indica a la taula-resum de l'esquerra.

Un cop comprovada la presència del cDNA del gen *Pfkfb4* en la població comercial de cDNAs de testicle humà, es van dissenyar quatre oligonucleòtids específics en orientació reversa amb inici dins el primer exó del gen, per a que conjuntament amb els dos oligonucleòtids en orientació directa que hibriden a la zona de l'adaptador, amplifiquessin un fragment que contingués sencera la regió 5'-transcrita i no traduïda del mRNA del gen *Pfkfb4*. El disseny experimental es mostra a la Figura 2.2, on només s'han representat un parell d'oligos específics del gen *Pfkfb4* en orientació reversa.



**FIGURA 2.2.** Esquema il·lustrant l'estratègia del 5'-RACE.

Així doncs, a partir de dues rondes de PCR s'aconsegueixen produir fragments de DNA que només difereixen en 100 parells de bases entre ells. En la primera ronda de PCR s'utilitzen els oligonucleòtids externs (un d'orientació directa que hibrida amb la seqüència adaptadora i l'altre d'orientació reversa que hibrida amb la seqüència del gen *Pfkfb4*) per hibridar amb el cDNA comercial que s'utilitzava com a motlle. En la segona ronda de PCR s'usen els oligonucleòtids interns (un d'orientació directa que hibrida amb la seqüència adaptadora i l'altre d'orientació reversa que hibrida amb la seqüència del primer exó del gen *Pfkfb4*) i com a motlle per reamplificar es va usar el DNA obtingut en la primera ronda de PCR. Els resultats de les PCR finals es mostra a la Figura 2.3.

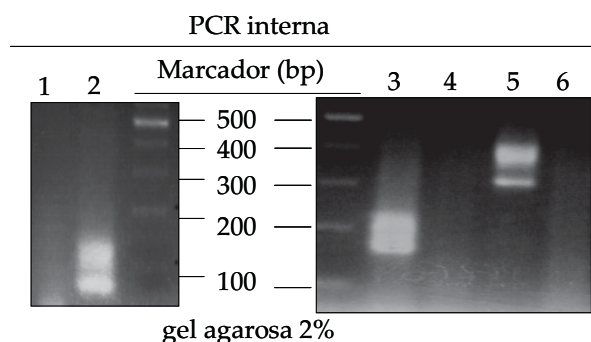
**A) PRIMERA PCR, a partir dels oligos externs:**

Adaptador (5'-3')	Específic del gen (5'-3')	Posició segons l'ATG
5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3'	3' Xho: 5'-CCTGAAGAAGATCTGGATGCCATAACACGAA-3'	+33
	Ex 2- Rev: 5'-GATTGGTGTGCCCACTCGG-3'	+190

SEGONA PCR, a partir dels oligos interns:

Adaptador (5'-3')	Específic del gen (5'-3')	Posició segons l'ATG
5'-CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGC-3'	Ex 1-Rev: 5'-GACTCATCCCGGCCCG-3'	-3
	#86: 5'-GCACGCTTGCCAGCGCGGTG-3'	+78

**B)**



**FIGURA 2.3. A) Taules resum dels oligonucleòtids usats a les dues rondes de PCR del 5'- RACE. B) 5'-RACE del gen humà *Pfkfb4*. Gel d'agarosa, al 2%, mostrant els productes de PCR obtinguts. Els carrils 2 i 3 corresponen al DNA resultant de la PCR feta amb l'oligonucleòtid 5'--RACE intern que és complementari a l'adaptador i els dos oligonucleòtids específics del gen *Pfkfb4*. Els carrils 1 i 4 corresponen als controls negatius de cada reacció. El carril 5 correspon al control positiu (control de la reacció de PCR) i el carril 6 és el seu negatiu.**

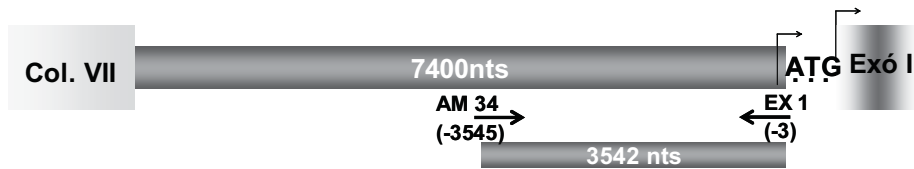
Els productes resultants de les dues rondes de PCR, es van clonar en el vector TOPO-TA, i aquest es va transformar en bacteris, els clons positius resultants es van analitzar mitjançant una PCR de seqüenciació. En concret es van analitzar 12 clons independents, trobant que l'inici de transcripció es correspon amb un residu citosina localitzat en la posició -25 a partir del codó ATG. Amb aquesta informació es va reenumerar la seqüència del gen *Pfkfb4*, i a la citosina d'aquesta posició se li va assignar el +1 del gen *Pfkfb4* humà (GeneBank NM 004567).

**Anàlisi de la seqüència corresponent a la regió promotora del gen *Pfkfb4***

Sabent que l'inici de transcripció del gen *Pfkfb4* està situat a -25 nucleòtids de distància de l'ATG i que a 7400 nucleòtids *upstream* finalitza el gen del *Col-lagen VII*, es va determinar que la regió

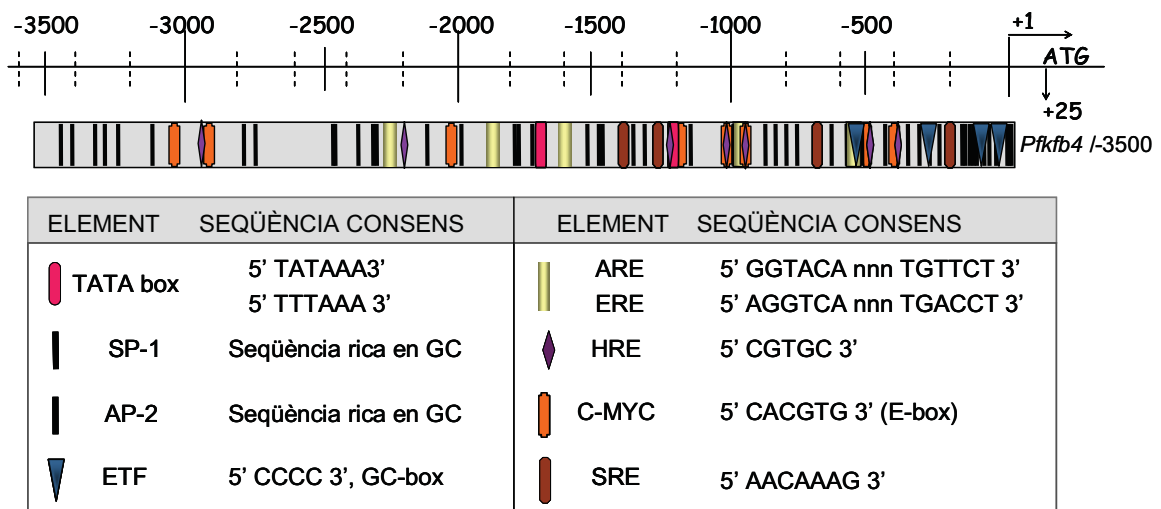


promotora del gen *Pfkfb4* quedaria limitada entre aquests 7400 nucleòtids. En una primera aproximació per caracteritzar el promotor, ens vàrem centrar en la regió dels primers aproximadament 4000 nucleòtids de la seqüència de DNA del PAC RP5-1034C16 (Figura 2.4) i es va dissenyar l'estratègia de clonatge d'aquesta regió com s'explica al següent apartat.



**FIGURA 2.4.** Esquema de la regió 5'- del gen *Pfkfb4*. La zona promotora ha d'estar limitada entre la fi del gen del col·lagen VII i l'inici de transcripció (a -25 nts de l'ATG). A sota del promotor es mostren les posicions (-3545 i -3) dels oligonucleòtids usats per a amplificar un fragment de la regió promotora d'aproximadament 3500 nucleòtids per PCR.

Una anàlisi exhaustiva, mitjançant l'ús de la base de dades TFSEARCH i amb el programa MatInspector, va permetre localitzar les posicions de seqüències consens per factors de transcripció. A la Figura 2.5 es mostra el resultat de la anàlisi.



**FIGURA 2.5.** Esquema de la localització de seqüències consens per possibles elements reguladors del promotor del gen *Pfkfb4*.

Aquesta anàlisi va posar de manifest diverses possibles caixes TATA (posicions -1257 i -1744 des de l'origen de transcripció), i un elevat nombre de seqüències riques en GC concentrades al voltant dels -200 nucleòtids més propers al codó ATG. En aquests dos-cents nucleòtids també es localitzarien seqüències d'unió als factors Sp1, APA-2 i ETF. Aquests factors tenen gran importància ja que qualsevol d'ells o conjuntament podrien actuar com a conductors de la transcripció basal del gen *Pfkfb4* ja que està descrit que ells sols poden dirigir la transcripció basal en els seus gens diana per

reconeixement de les seqüències riques en GC a les que s'uneixen (Kageyama et al., 1989; Mastrangelo et al., 1991; Su et al., 1991).

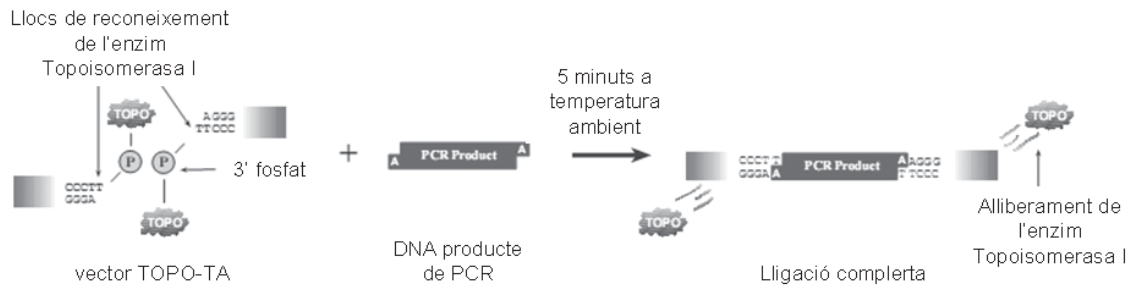
Així mateix, es van identificar possibles seqüències consens per a factors de transcripció molt significatius a testicle, com són els elements de resposta a hipòxia (HRE) a les posicions -404, -492, 943, -1036, -1229, -2200 i -2890 (5'-CGTG-3') (Wenger et al., 2005), elements de resposta a hormones (testosterona, estrogen) (ARE: 5'-GGTACA nnn TGTTCT -3' i ERE: 5'-AGGTCA nnn TGACCT -3', respectivament) a les posicions -506, -990, -1609, -1891 i -2292 (Devos et al., 1997; O'Lone et al., 2004). Aquests factors són importants a testicle durant l'espermatogènesi, ja que d'una banda hi ha hipòxia perquè es redueix la pressió d'oxigen en el túbul seminífer segons progressen les cèl·lules germinals cap al lumen, i de l'altra existeix un control hormonal de l'espermatogènesi, essent la testosterona el principal regulador hormonal.

A la seqüència promotora de *Pfkfb4* també hi són presents possibles motius d'unió a proteïnes Sox (SRE), les quals juguen un paper clau en la formació i en el desenvolupament del testicle, a les posicions -200, -696, -1280, -1411 (5'-AACAAAG -3') (Frojdman et al., 2000; Mertin et al., 1999; Vidal et al., 2001). Així com seqüències d'unió al protooncogen c-Myc (5'-CACGTG, també anomenades E-box) a les posicions -406, -492, -943, -1036, -1229, -2023, -2890 i -3021 (Kim et al., 2004). Aquest últim factor, és important en els sistemes proliferatius, com pot ser l'epiteli seminífer, on està descrit que regula el creixement i la proliferació cel·lular, el metabolisme, la síntesi de macromolècules i l'apoptosi.

En definitiva, totes aquestes seqüències podrien participar en la regulació de l'expressió del gen *Pfkfb4* humà.

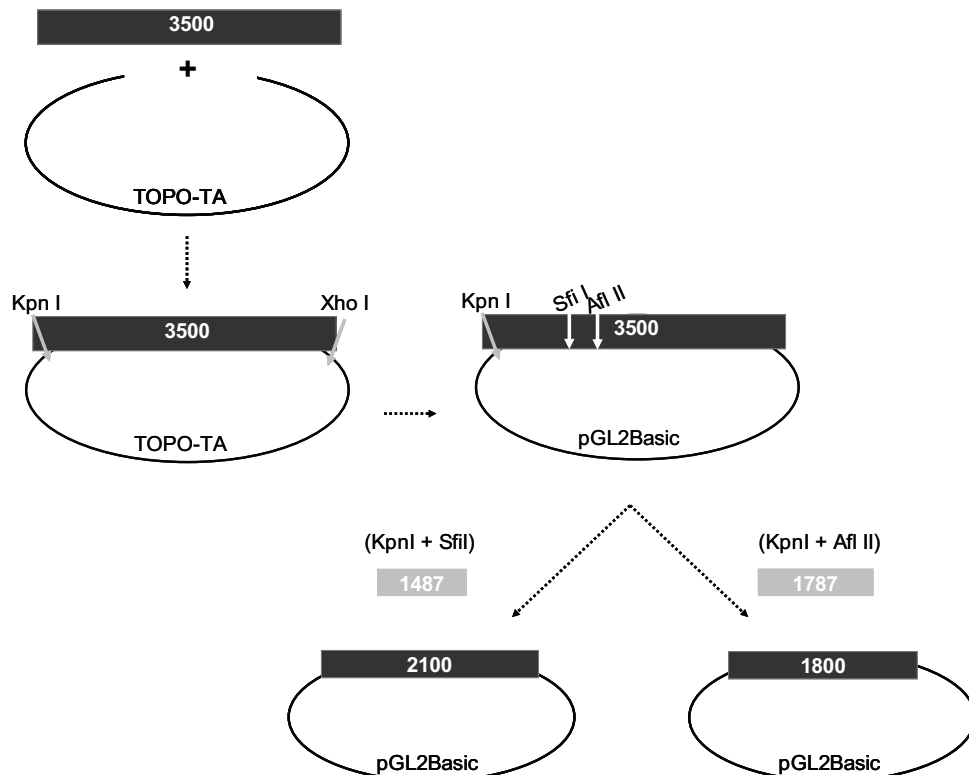
### **Clonatge de diversos fragments de la regió promotora del gen *Pfkfb4***

Amb la finalitat d'abordar el clonatge de les possibles regions funcionals del promotor, es van dissenyar una sèrie de construccions de la regió promotora utilitzant el PAC RP5-1034C16. Primer es van generar diversos oligonucleòtids per amplificar, per PCR, dos fragments de 3500 i 1077 nucleòtids. Els fragments amplificats es van introduir al vector TOPO-TA (Invitrogen), que es troba linearitzat i presenta residus de Timina als extrems -3', facilitant la clonació directa de fragments de PCR amb gran eficàcia. A més, també es troba unit al vector l'enzim Topoisomerasa, que s'encarrega de lligar el fragment de DNA al vector. Amb aquest sistema s'aconsegueix completar, satisfactòriament, la lligació dels fragments de DNA introduïts (Figura 2.6).



**FIGURA 2.6. Esquema del funcionament del vector TOPO-TA (Invitrogen).** Els fragments de PCR produïts per la Taq polimerasa porten als extrems -3' una Adenina, mentre que el vector TOPO porta una Timina als extrems -3' que facilita la lligació directa dels fragments de PCR fets per la Taq polimerasa, així com l'enzim topoisomerasa I.

De la mateixa manera, aquest vector presenta, als seus extrems, diverses dianes per a enzims de restricció per tal de facilitar la posterior subclonació d'aquells fragments introduïts cap a altres vectors d'interès. En el nostre cas es va seleccionar el vector d'expressió luciferasa pGL2Basic (Progema). En primer lloc es va generar la construcció *Pfkfb4*-3500, utilitzant les dianes de restricció *KpnI* (pròpia del fragment de PCR) i *XhoI* (pròpia del vector TOPO-TA) per alliberar el fragment de 3500 nts del vector TOPO i subclonar-ho de forma dirigida al vector pGL2Basic. Per generar la construcció *Pfkfb4*-1077 es van utilitzar les dianes de restricció *XhoI* i *HindIII* (pròpies del vector TOPO-TA) per alliberar el fragment de 1077 nts i subclonar-lo al vector pGL2Basic (Figura 2.7).



**FIGURA 2.7A. Esquema de l'estratègia de les digestions i subclonatsges realitzats per obtenir les construccions en el vector pGL2Basic.** Es van anomenar: *Pfkfb4*-3500, *Pfkfb4*-2100 i *Pfkfb4*-1800.

Ambdues construccions es van digerir amb combinacions d'enzims de restricció de tall únic, per tal d'aconseguir una àmplia bateria de construccions que continguessin fragments deleccionats de la regió 5'- flanquejant del gen *Pfkfb4*. D'aquesta manera i segons es mostra a la Figura 2.7A, la construcció *Pfkfb4*/-3500 es va digerir amb *KpnI* i *SfiI* (que allibera un fragment de 1487 nts de l'extrem 5'- del clon sencer) o bé *KpnI* i *AflII* ( que allibera un fragment de 1787 nts també de l'extrem 5'-). Després de comprovar que s'havien alliberat els respectius fragments de 1487 i 1787 nts, es va procedir a la religació del clon pGL2Basic original. Es van obtenir dues noves construccions de 2100 i 1800 nucleòtids, anomenades *Pfkfb4*/-2100 i *Pfkfb4*/-1800, respectivament (Figura 2.7A)

A partir del fragment de 1077 nucleòtids clonat en el vector TOPO-TA, digerint-lo amb *MluI* i *HindIII* se'n va alliberar un fragment de 428 nucleòtids que es va lligar al vector pGL2Basic, obtenint-se la construcció *Pfkfb4*/-428. Aquesta nova construcció, al seu torn, també es va digerir amb la combinació d'enzims següents: *MluI*+*PvuII* (eliminant-se un fragment de 166 nucleòtids) i *PvuII*+*HindIII* (alliberant-se un fragment de 266 nucleòtids), obtenint dues noves construccions; *Pfkfb4*/-166 i *Pfkfb4*/-428Δ(-166), respectivament (Figura 2.7B).

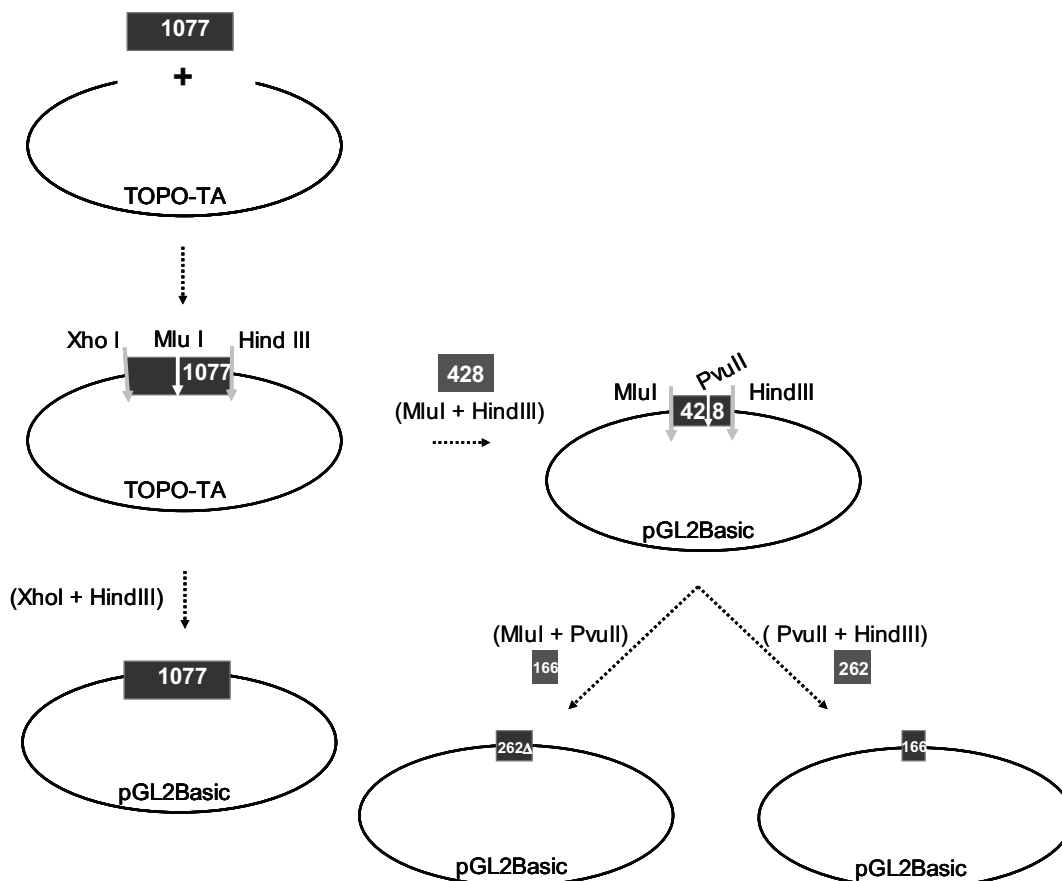


FIGURA 2.7B. Esquema de l'estratègia de les digestions i subclonats realitzats per obtenir les construccions en el vector pGL2Basic. Es van anomenar: *Pfkfb4*/-1077, *Pfkfb4*/-428, *Pfkfb4*/-166 i *Pfkfb4*/-428Δ(-166) de la regió promotora del gen *Pfkfb4*.

Les construccions generades es van anomenar segons la seva mida complerta en nucleòtids. A més, contenen l'inici de transcripció a excepció de la construcció *Pfkfb4/-428Δ(-166)*, que té una delecció de 166 nucleòtids al seu extrem -3'. En definitiva, es va aconseguir generar una bateria de deleccions que va permetre obtenir un total de set construccions que es mostren a l'esquema de la Figura 2.8. Les identitats de les quals van ser confirmades amb diverses digestions i, finalment, amb una PCR de seqüenciació per verificar-ne la seqüència continguda.

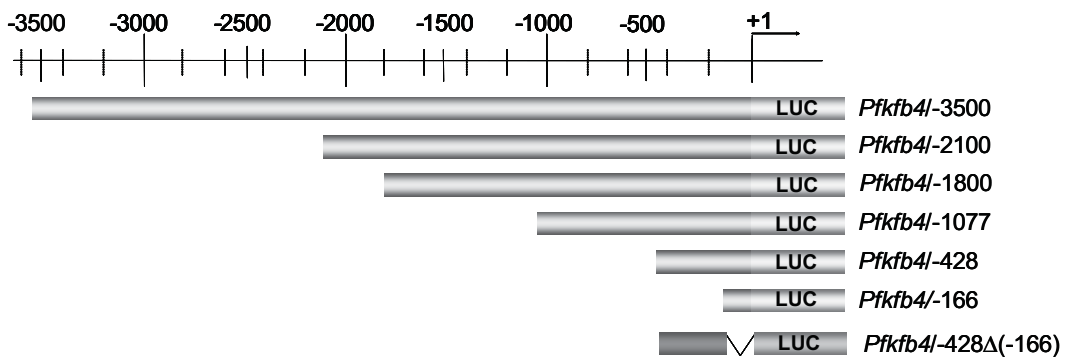


FIGURA 2.8. Esquema de la bateria de construccions obtingudes de la regió 5'-del gen *Pfkfb4*.

## Transfeccions transitòries en línies cel·lulars

Amb la bateria de construccions obtingudes de la regió 5'- promotora *Pfkfb4*, es va iniciar l'estudi de la seva. En primer lloc però, s'havia de trobar el sistema cel·lular més adient per dur a terme les transfeccions transitòries del promotor.

Donat que els resultats del capítol anterior indicaven que l'expressió de la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) es trobava restringida a les cèl·lules germinals, es va decidir utilitzar un model cel·lular pròxim per poder emprendre un estudi de regulació transcripcional que tingués sentit fisiològic. Per tant, es varen buscar línies cel·lulars relacionades directament amb el testicle. No obstant, a l'ATCC de línies cel·lulars humanes derivades de testicle només vam trobar aquelles d'origen tumoral. Apart, es varen trobar tres línies cel·lulars diferents de testicle de ratolí que no derivaven de tumors: TM-4 provinent de cèl·lules de Sertoli, GC-1 spg que deriva d'espermatogonis tipus B i GC-2 spd (ts) generada a partir d'espermatòcits premeiòtics. A la següent taula es resumeixen les seves característiques principals:

TIPUS CEL·LULAR	ANIMAL del que prové	CARACTERÍSTIQUES
TM4 (CRL- 1715)	<i>Mus Musculus</i>	Cèl·lula de Sertoli Presenta els receptors hormonals: FSHR, AR i PR
GC-1 spg (CRL- 2053)	<i>Mus Musculus</i>	Espermatogoni tipus B – Espermatòcit primari. Proteïnes específiques de testicle: Citocrom c i LDH 4.
GC-2 spd(ts) (CRL-2196)	<i>Mus Musculus</i>	Espermatòcit aturat a la fase premeiòtica

TAULA 2.1. Principals característiques de les cèl·lules testiculars amb que s'ha treballat. FSHR: Receptor de l'hormona estimulant del Fol·licle, AR: Receptor d'andrògens, PR: Receptors de progesterona.

Segons la bibliografia existent, aquests tres tipus cel·lulars es transfecten de forma òptima amb diferents sistemes, com per exemple: electroporació (Marti et al., 2002), FUGENE6 (Illman et al., 2001) i Lipofectamina (Wilkerson et al., 2002a; Wilkerson et al., 2002b; Yang and Thomas, 1997). Per confirmar-ho, i alhora provar altres mètodes de transfecció disponibles al laboratori, es va transfectar un plasmidi d'expressió de la proteïna GFP (*Green Fluorescent Protein*) a les cèl·lules TM-4 amb diferents agents (PEI, FUGENE 6, Lipofectina i Lipofectamina 2000), obtenint-se els millors resultats de transfecció amb l'agent Lipofectamina 2000 segons la relació 1 µg de DNA per 2 µl de Lipofectamina. De la mateixa manera, es va comprovar el sistema de transfecció per Lipofectamina 2000 amb les cèl·lules germinals GC-2 spd(ts) amb semblants resultats. Es va aconseguir una eficiència de transfecció de l'ordre del 30-40%. Tot i que en principi no semblaria ser una eficiència gaire bona, amb els altres agents o no es van aconseguir transfectar les cèl·lules o només es van obtenir un nivells de transfecció al voltant de l'1%. Els resultats de les transfeccions amb la construcció de GFP es mostren a la Figura 2.9.

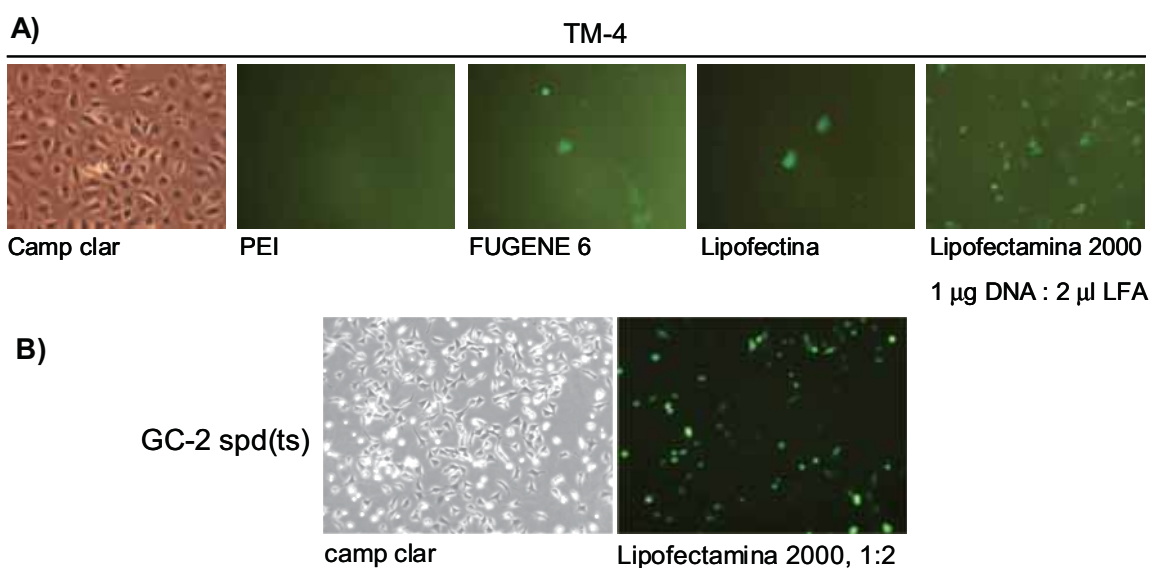


FIGURA 2.9. Determinació de l'agent de transfecció en un sistema cel·lular testicular. A) Cèl·lules TM4 (Sertoli) transfectades amb GFP mitjançant diferents agents: PEI, FUGENE 6, Lipofectina i Lipofectamina 2000. B) Cèl·lules GC-2spd(ts) transfectades amb GFP mitjançant Lipofectamina 2000.

Un cop triat el mètode de transfecció es va posar apunt el protocol a seguir, que es resumeix a continuació:

1. Es planten les cèl·lules en plaques de 6 pous ( $9.5\text{cm}^2/\text{pou}$ ;  $9.5 \cdot 10^5$  cèl·lules/pou) el dia abans de la transfecció
2. Es transfecten seguint les instruccions del fabricant, a la proporció de  $1\mu\text{g}$  de DNA de la construcció promotora conjuntament amb  $60\text{ ng}$  de  $\beta$ -galactosidasa (per corregir les lectures de luciferasa) per  $2\mu\text{l}$  de Lipofectamina 2000, a cada pou.  
Per a les cèl·lules TM4 i GC-1 no cal canviar el medi de transfecció (OPTIMEM) però, a les cèl·lules GC-2 sí que s'ha de canviar passades 5 hores pel propi medi de cultiu (DMEM, 10% FBS).
3. Al dia següent, les cèl·lules transfectades es subdivideixen, es passen a plaques de 24 pous ( $1.9\text{cm}^2/\text{pou}$ ;  $1.9 \cdot 10^5$  cèl·lules/pou) segons la raó 1 pou de la placa de 6, per 6 pous de la placa de 24. Després de 6 hores, es comprova el seu estat d'adhesió i es canvia el medi de cultiu per un medi basal sense sèrum durant tota la nit.
4. Es tracten les cèl·lules entre 16-24 hores, depenent del tractament triat.
5. Es lisen les cèl·lules i es procedeix a fer les lectures d'activitat luciferasa i  $\beta$ -galactosidasa, amb els respectius kits.

## Caracterització de la regió mínima promotora

A continuació es va iniciar l'estudi de la regulació transcripcional de la regió promotora del gen *Pfkfb4*, a partir de la bateria de construccions que s'havien obtingut per clonació. En primer lloc es va voler identificar la regió mínima del promotor que requereix el gen per expressar-se sense cap estimulació. Amb aquesta finalitat es van transfectar transitòriament les construccions *Pfkfb4*-1800, *Pfkfb4*-1077, *Pfkfb4*-428, *Pfkfb4*-166 i *Pfkfb4*-428 $\Delta$ (-166), segons el protocol descrit a l'apartat anterior, a les cèl·lules GC-1 spg (espermatogoni).

Segons els resultats de la Figura 2.10, s'observa que l'activitat basal que presenten les diferents construccions mostren que com a mínim els primers 141 pb de la regió 5'- des de l'inici de transcripció serien necessaris per mantenir un mínim nivell basal de transcripció del gen *Pfkfb4* humà a les cèl·lules espermatogèniques. No obstant, aquesta regió no conté cap seqüència consens per alguna caixa TATA, però sí és abundant en caixes GCs i a més hi ha seqüències ETF (seqüències riques en C i/o GC), les quals s'ha descrit per a altres gens que són capaces, per si soles, de promoure la transcripció de promotors on manquen caixes TATA (Kageyama et al., 1989).

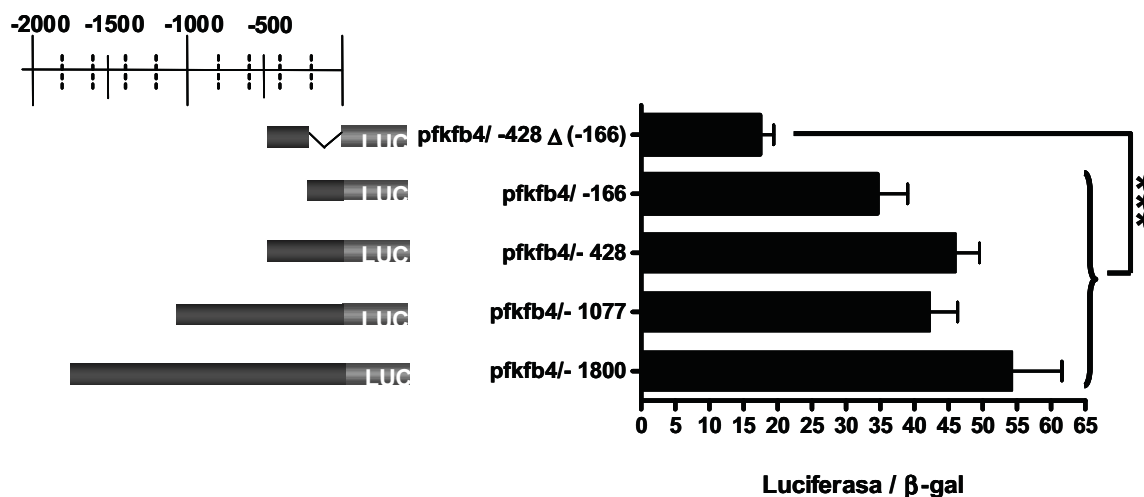


FIGURA 2.10. Determinació de la regió mínima promotora del gen *Pfkfb4* humà. Les diferents construccions del promotor *Pfkfb4* es van transfectar transitòriament a cèl·lules GC-1( spg) amb 60 ng del vector d'expressió β-galactosidasa. Passades 48h de la transfecció es varen analitzar les activitats luciferasa i β-galactosidasa. Els valors de luciferasa estan normalitzats amb els de β-galactosidasa. Les transfeccions es van realitzar com a mínim per triplicat, i es van fer les mitjanes dels valors individuals per a donar el resultat d'un experiment. Es representa la mitjana de tres experiments independents ± S.E. (\*\*\*)=(P<0.001).

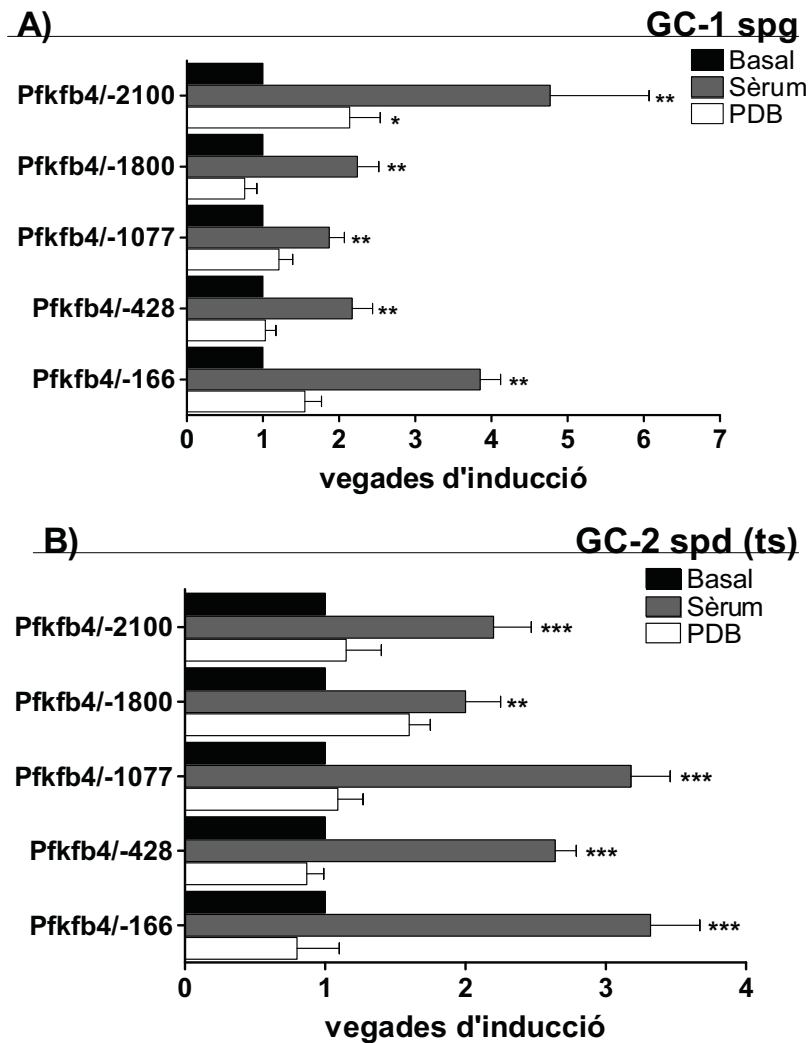
### Estudi de la resposta del promotor al sèrum i als èsters de forbol

Seguidament, es va estudiar la resposta del promotor del gen *Pfkfb4* enfront als estímuls provinents de dos agents mitogènics com són el sèrum i els èsters de forbol (PDB; Forbol 12, 13 dibutirat). Gràcies a la gran riquesa en factors de creixement que té el sèrum, és molt factible que aquest provoqui una estimulació transcripcional respecte a les mateixes condicions en medi mínim. Per la seva part, els èsters de forbol estan ben descrits com agents mitogènics i estan relacionats amb un augment de la taxa glucolítica en paral·lel amb increments en la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i en l'activitat PFK-2. Aquest augment es deu a efectes del tractament amb PDB sobre la transcripció així com sobre la traducció (Denis-Pouxviel et al., 1990; Navarro-Sabate et al., 2001; Riera, 2002). Els èsters de forbol poden activar vies de transducció de senyals on està implicada la proteïna cinasa C (PKC) i entre els efectors de la via hi ha diversos factors de transcripció que s'uneixen a la seqüència promotora del gen diana. Aquests elements poden ser *Activator protein -1* (AP-1), AP-2 o NFκB (Gong et al., 1992a; Gong et al., 1992b)

Es varen transfectar transitòriament les cèl·lules germinals GC-1 spg i GC-2 spd(ts), derivades d'espermatozois i espermatòcits, respectivament, amb les construccions del promotor descrites anteriorment. Així doncs, després de la transfecció dels diferents plasmidis, les cèl·lules es van sotmetre als tractaments amb 10% sèrum o 20 nM de PDB. Els efectes d'aquests tractaments,



durant 16 hores, es mostren com a vegades d'inducció de l'activitat relativa de la luciferasa, del plasmidi assajat sota els tractaments, respecte al nivell basal d'activitat de la mateixa construcció sense tractament (a qui se li va assignar el valor de 1). Per poder comparar entre les diferents construccions es van corregir els resultats per la seva corresponent activitat  $\beta$ -galactosidasa. Els resultats de les transfeccions es mostren a la Figura 2. 11.



**FIGURA 2.11. Resposta del promotor al sèrum i als èsters de forbol.** Activitat luciferasa a les cèl·lules GC-1 spg (A) i GC-2 spd (ts) (B) transfectades amb diferents construccions del promotor *Pfkfb4* i tractades amb 10% sèrum o 20 nM de PDB. Es van realitzar un mínim de tres experiments independents amb triplicats. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la mateixa construcció sense tractar (0% sèrum) que s'agafa com a 1. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de  $\beta$ -galactosidasa. Es representa la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  S.E. (\*)=( $P<0.1$ ), (\*\*)=( $P<0.01$ ) i (\*\*\*)=( $P<0.001$ ).

A les cèl·lules GC-1 spg (Figura 2.11A), el sèrum va augmentar l'activitat luciferasa a totes les construccions assajades, trobant-se les majors respostes a les construccions *Pfkfb4*/-166 (un increment de 3.8 vegades) i *Pfkfb4*/-2100 (amb 4.7 vegades d'increment). Aquest efecte es deuria, possiblement, a l'activació de qualsevol dels múltiples factors de creixement que són presents en el

sèrum fetal. D'altra banda, els èsters de forbol (PDB) només van produir un increment significatiu (de 2 vegades) dels valors de luciferasa a la construcció *Pfkfb4/-2100*, que es perdria a la construcció de 1800 nucleòtids, indicant que la regió d'uns 300 nucleòtids que hi ha entre els fragments *Pfkfb4/-1800* i *Pfkfb4/-2100* podria ser important per explicar la resposta als èsters de forbol en els espermatogonis. Tot i que a la seqüència promotora hi ha diversos elements AP-2 que podrien estar implicats en els efectes del PDB, si s'analitza en detall la seqüència de 300 nts en que es diferencien les construccions *Pfkfb4/-1800* i *Pfkfb4/-2100*, s'ha trobat un element AP-2, a la posició -1894, que podria explicar la resposta del promotor a aquest tractament.

Pel que fa a les cèl·lules GC-2 spd (Figura 2.11B), el sèrum també va incrementar l'activitat luciferasa a totes les construccions assajades entre 2 i 4 vegades. En canvi, els èsters de forbol (PBD) no van induir cap resposta en els valors de luciferasa de les construccions estudiades.

## **Hipòxia i testicle, efectes sobre tPFK-2.**

Degut a l'elevada distància de difusió als túbuls seminífers i a la gran taxa de consum d'oxigen per part de les cèl·lules proliferants, les pressions parcials d'oxigen tant al lumen tubular com a l'epidídim són considerablement baixes, gairebé es podrien considerar hipòxiques en comparació amb la regió basal. A més, les transformacions que pateix l'espermatozoide durant la capacitació, la motilitat, la reacció de l'acrosoma i la fertilització són processos altament dependents de l'aport energètic via la glucòlisi anaeròbica i, pràcticament, es desenvolupen en condicions anaeròbiques. Per tant, cal suposar que els enzims glucolítics amb isoformes d'expressió específica al testicle han d'adaptar-se a aquest microambient hipòxic.

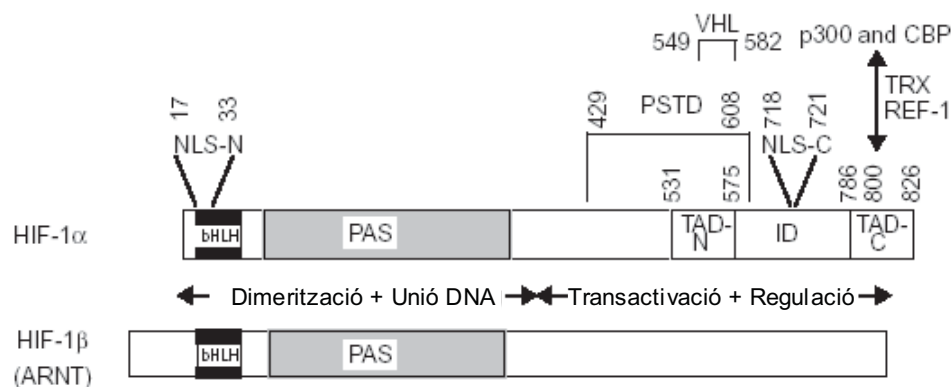
S'han descrit diversos factors de transcripció que responen a la hipòxia controlant, de retruc, la resposta dels seus gens diana a les baixes pressions d'oxigen (Cummins and Taylor, 2005). Alguns d'ells són importants al testicle, en aquest treball ens centrarem en els factors HIF-1, Sp-1 i c-Myc.

## **HIF-1**

Un dels mediadors de la resposta a les baixes pressions d'oxigen és el factor de transcripció induïble per hipòxia (HIF). És una proteïna dimèrica formada per dues subunitats,  $\alpha$  i  $\beta$ , les quals són

membres de la família de factors de transcripció bàsic hèlix-loop-hèlix-Per/Arnt/Sim (bHLH-PAS) (Wang et al., 1995). En els mamífers s'han descrit tres gens que codifiquen per la subunitat  $\alpha$ : *Hif-1*, *2* i *3*. La proteïna HIF-1 $\alpha$  s'expressa de forma ubiqua en l'organisme, mentre que els seus paràlegs ho fan de forma més restringida. Els nivells proteics de la subunitat  $\alpha$  (independentment del gen que la codifiqui) es regulen en funció de la concentració d'oxigen. En canvi, la subunitat  $\beta$  s'expressa de forma constitutiva, essent insensible als canvi en la disponibilitat d'oxigen (Hirota and Semenza, 2005).

HIF $\alpha$  dimeritza amb HIF $\beta$  (també anomenat ARNT) via el domini bHLH i part del PAS, un cop el complex s'ha format s'uneix al DNA pel mateix domini bHLH (Jiang et al., 1996). Els heterodímers formats per HIF-1 $\alpha$  i per HIF-2 $\alpha$  activen la transcripció dels gens diana gràcies a dos dominis de transactivació localitzats a la zona C-terminal de la subunitat  $\alpha$ . Aquests dominis de transactivació li permeten interaccionar amb coactivadors transcripcionals. Però l'heterodímer format per HIF-3 $\alpha$  és un inhibidor transcripcional degut a que presenta un domini PAS inhibitori (IPAS). La subunitat HIF-1 $\alpha$ , als extrems N- i C-terminal té seqüències de localització nuclear (NLS). Presenta, a més, un domini de transactivació ric en Pro-Ser-Thr (PSTD), en el que es controla, per part de l'oxigen, la degradació de la proteïna. També té llocs d'unió per les proteïnes VHL, p300 i CBP (Semenza, 2001a; Semenza, 2001b). A la Figura 2.12 es mostra un esquema de les proteïnes HIF1 $\alpha$  i HIF 1 $\beta$  amb els seus dominis.



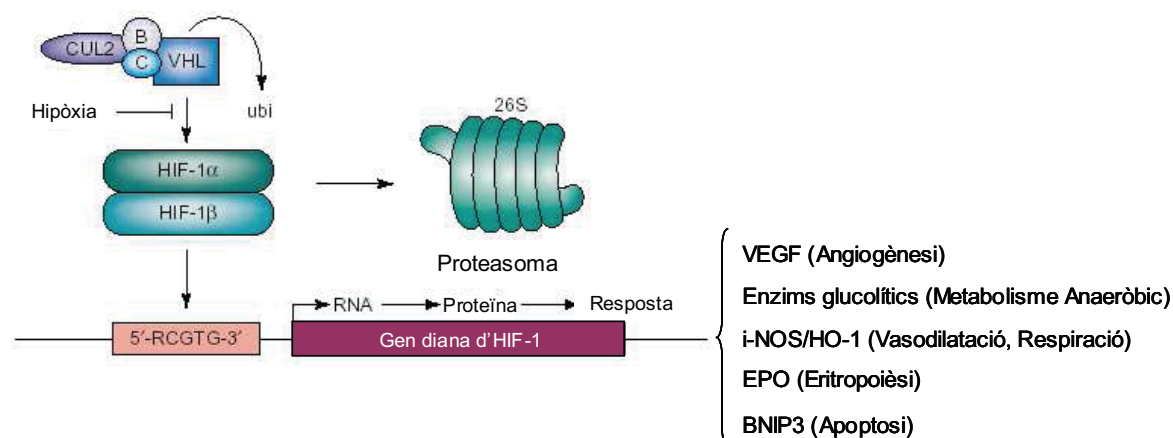
**FIGURA 2.12. Esquema de les proteïnes HIF-1 amb els seus dominis.** Les subunitats HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$  es mostren amb els dominis bàsic helix-loop-helix (bHLH) i PER-ARNT-SIM (PAS), els quals són necessaris per a la dimerització i la posterior unió al DNA (Semenza, 2001a)

Els elements de resposta a hipòxia (HRE) que reconeix HIF en els promotors dels gens diana tenen la seqüència consens 5'- **CGTG** -3'. Els nucleòtids de les posicions adjacents, en especial a 5', també són importants en la resposta hipòxica, així, a 5'- majoritàriament s'hi troben A > G > C > T i a -3' hi ha C > G = T = A (Wenger et al., 2005). Tanmateix, HIF-1 $\beta$  també pot formar homodímers i unir-se a la seqüència palindròmica 5'- **CACGTG** -3', fet que explicaria que aquesta seqüència HRE no

sigui tan bona per conduir la resposta transcripcional a la hipòxia com les altres seqüències HRE (TACGTG o GACGTG) (Wenger et al., 2005).

D'altra banda, el domini **CGTG** és imprescindible pel reconeixement i la interacció amb HIF 1, però un element HRE funcional conté, a les seves proximitats, llocs d'unió per altres factors de transcripció addicionals. Aquests altres factors de transcripció amplifiquen la resposta a la hipòxia o bé confereixen especificitat tissular a la resposta. Per exemple, HIF 1 coopera amb els factors ATF-1 i CREB-1 per activar transcripcionalment el gen LDH-A, amb el factor AP-1 per activar el gen VEGF (Wenger et al., 2005) o amb el factor Sp1 en el cas de l'anhidrasa carbònica (Kaluz et al., 2003). També, en els gens diana per HIF1 les seqüències HRE es presenten formant tàndems, els membres dels quals es troben separats per només uns pocs nucleòtids (Obach et al., 2004; Semenza et al., 1996).

HIF-1 $\beta$  és una proteïna d'expressió constitutiva, però HIF-1 $\alpha$  és hidroxilada en condicions de normòxia i degradada via proteosoma, tal com es representa a la Figura 2.13 (Maxwell et al., 2001).



**FIGURA 2.13. Regulació dels gens diana per HIF-1.** En condicions de normòxia, el factor von Hippel-Lindau (VHL) s'uneix a la subunitat HIF1 $\alpha$ , que és hidroxilada, reconeguda i degradada pel proteosoma. En condicions hipòxiques, s'acumula la proteïna HIF1 $\alpha$  que s'uneix amb la proteïna HIF1 $\beta$ . El dímer reconeix la seqüència diana HRE (5'--RCGTG--3') en els promotors dels seus gens diana. La unió de HIF1 al promotor, activa la transcripció dels gens diana que resulta en un augment de la síntesi de la proteïna que produeix els efectes biològics de la hipòxia (Semenza, 2001b).

Les reaccions d'hidroxilació depenen de la presència d'oxigen, ferro i 2-oxoglutarat, per tant, en condicions d'hipòxia o en presència d'un quelant de ferro, les hidroxilases no funcionen i s'acumula HIF-1 $\alpha$  a la cèl·lula (Hirota and Semenza, 2005), que transloca al nucli, dimeritza amb HIF-1 $\beta$  i, tots dos, s'uneixen als elements de resposta a hipòxia (HRE) que es troben a la seqüència dels gens diana (Semenza, 2001b).

Apart de la concentració intracel·lular d'oxigen, existeixen altres mecanismes per a estabilitzar la subunitat HIF-1 $\alpha$ , com per exemple els productes finals de la glucòlisi, com el lactat i el piruvat, que s'acumulen com a resultat de l'efecte Warburg i són capaços de promoure l'estabilitat de HIF-1 $\alpha$  i per tant la seva acumulació, la unió amb HIF-1 $\beta$ , i la posterior activació dels gens diana (Lu et al., 2002). No obstant, degut a la importància de HIF-1 en nombrosos processos biològics, l'expressió i l'activitat de la subunitat HIF1 $\alpha$  s'ha descrit que a part de la hipòxia, també es regula per mitjà de les vies de transducció de senyals com PI3K/AKT i ERK/MAPK (Semenza, 2002).

S'han descrit més de 60 gens que són activats transcripcionalment pel factor HIF 1 $\alpha$  (Hirota and Semenza, 2006; Semenza, 2003). Aquests gens abasten un ampli ventall de processos biològics, així trobem implicats en la proliferació i la supervivència cel·lular, l'apoptosi, la motilitat, l'estructura del citoesquelet, l'eritropoesi, l'angiogènesi i, fins i tot, el metabolisme cel·lular, alguns dels quals es resumeixen a la Figura 2.13. Pel que respecta als gens que codifiquen per la PFK-2/FBPasa-2 (*Pfkfb1-4*), en sotmetre els teixits d'un animal a hipòxia real es va observar per Northern blot que es produïa un augment del mRNA dels quatre gens de la PFK-2 (Minchenko et al., 2003). Així mateix, el nostre laboratori va descriure que el factor HIF1 $\alpha$  està directament implicat en la resposta transcripcional del gen *Pfkfb3* en un model de glioblastoma humà (Obach et al., 2004).

L'any 2002, Marti i col·laboradors van publicar la identificació d'una isoforma del factor HIF-1 $\alpha$  d'expressió específica a testicle a ratolins (Marti et al., 2002), i més tard va aparèixer publicat en humans (Depping et al., 2004). La isoforma de HIF1 $\alpha$  humana específica de testicle (hHIF 1Te) es caracteritza per la manca de 59 aminoàcids del domini bHLH. Aquesta delecció li comporta la pèrdua de la capacitat d'unió al DNA, però resta intacta la capacitat de dimeritzar amb la subunitat HIF1 $\beta$ . Així doncs, en situacions d'hipòxia hHIF 1Te es comportaria una isoforma dominant negativa, que regularia l'activitat del factor ubic HIF-1.

Durant l'espermatogènesi es produeix un canvi d'isoforma entre el factor HIF 1 $\alpha$  ubic i l'específic de testicle (Marti et al., 2002). Les cèl·lules de Sertoli i les germinals premeiòtiques (que són les més properes a la zona basal) expressen els transcrits de la isoforma ubíqua: HIF1 $\alpha$ , i a les cèl·lules postmeiòtiques es dona un descens de la transcripció. En canvi, els transcrits de la isoforma específica de testicle: HIF1 $\alpha$ Te, només es localitzen en les espermatides abans de ser alliberades al lumen tubular.

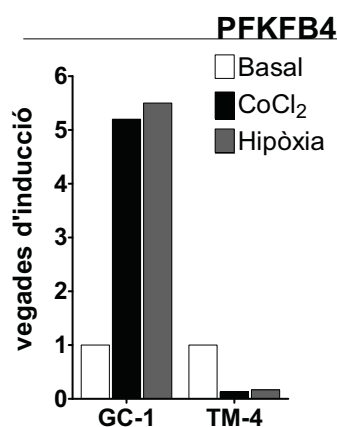
Com a conseqüència de la dimerització entre el dominant negatiu hHIF 1Te i HIF1 $\beta$ , es reduiria el nombre de subunitats HIF1 $\beta$  lliures i susceptibles de dimeritzar amb la subunitat HIF 1 $\alpha$  ubíqua. Degut a la competència entre les subunitats HIF1 $\alpha$  ubíqua i hHIF 1Te per unir-se amb HIF1 $\beta$ ,

l'activació dels gens diana deguda al factor ubic HIF-1 aniria disminuint al llarg de l'espermatogènesi (Depping et al., 2004; Wenger and Katschinski, 2005). En la silenciació dels gens diana del factor ubic HIF 1 a les cèl·lules espermàtiques postmeiòtiques s'ha de sumar també l'efecte de la reducció dels transcrits de la subunitat HIF 1 $\alpha$  ubica que comporta un canvi d'isoforma en favor de l'específica: hHIF1 $\alpha$  Te. Per aquestes raons, a les espermatides l'expressió dels gens diana de HIF 1 ubic podria arribar a ser nul·la (Depping et al., 2004; Marti et al., 2002). Molts d'aquests gens diana codifiquen per a proteïnes d'expressió ubica i que, al seu torn, també presenten isoformes d'expressió específica a testicle, per exemple els enzims glucolítics com la gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa-2 (Welch et al., 2006).

Amb tots aquests antecedents ens vam plantejar l'estudi del promotor *Pfkfb4* en condicions d'hipòxia.

### Efectes de la hipòxia en l'expressió de l'enzim tPFK-2 en cèl·lules de testicle.

Partint d'aquests fets es va estudiar com afectava la disminució de la pressió d'oxigen a l'expressió de la isoforma tPFK-2. Amb aquest objectiu es van sotmetre les línies cel·lulars TM4 (de Sertoli) i GC-1 spg (germinal derivada d'espermatogoni) a diferents tractaments hipòxics: (a) tractament amb 200  $\mu$ M de clorur de cobalt (CoCl<sub>2</sub>, un metall de transició que mimetitzava l'efecte de la disminució d'oxigen activant el factor HIF-1) dins del seu incubador habitual (5 i 10% de CO<sub>2</sub>, respectivament), (b) tractament de les cèl·lules en un incubador especial on la pressió d'oxigen es va reduir fins a l'1% (hipòxia real). Les cèl·lules es van recollir a les 16 hores de tractament i es va analitzar l'expressió de la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) per Western blot. A la Figura 2.14, es mostren les densitometries obtingudes corregides per l'expressió de tubulina.

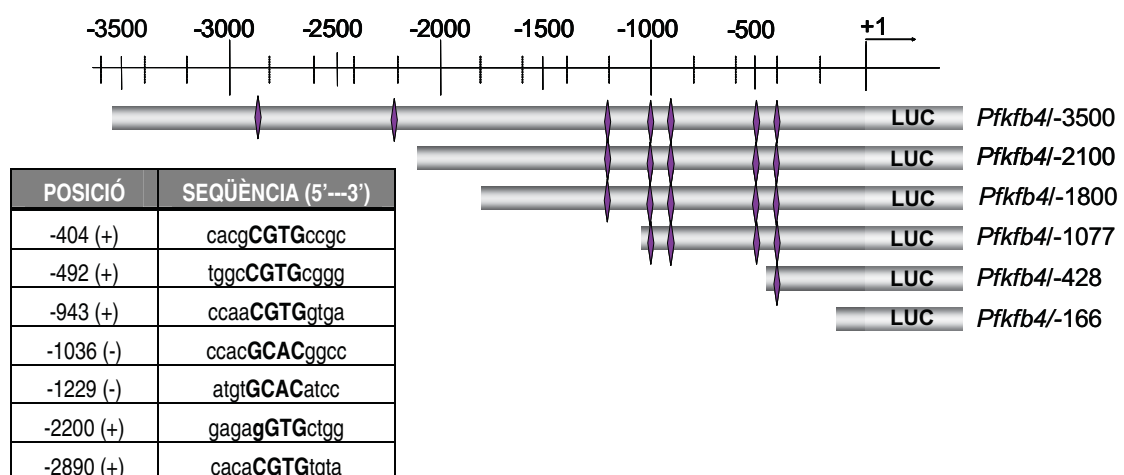


**FIGURA 2.14.** Expressió de la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) en les cèl·lules testiculars GC-1 spg (espermatogoni) i TM-4 (Sertoli) en condicions hipòxiques. Les cèl·lules es van mantenir en condicions de normòxia (basal) o incubades durant 16 hores en presència de 200  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub> o bé en condicions d'hipòxia a l'1% d'oxigen. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la mostra sense tractar que s'agafa com a 1. Es va utilitzar  $\alpha$ -tubulina com a normalitzador de càrrega.

A les cèl·lules espermàtiques GC-1 s'incrementava més de cinc vegades l'expressió de la proteïna tPFK-2 en condicions d'hipòxia (tant química com real) quan es comparava amb l'expressió basal. En canvi, a les cèl·lules de Sertoli, TM-4, la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) en hipòxia veia reduïda la seva expressió en un 80% respecte el basal. Aquests resultats ens indicaven que tant la hipòxia a l'1% d'oxigen com la incubació amb l'agent químic  $\text{CoCl}_2$ , que mimetitzava la hipòxia, produïen un increment dels nivells de la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) en les cèl·lules germinals GC-1 spg quan es comparaven amb el seu valor basal (normòxia).

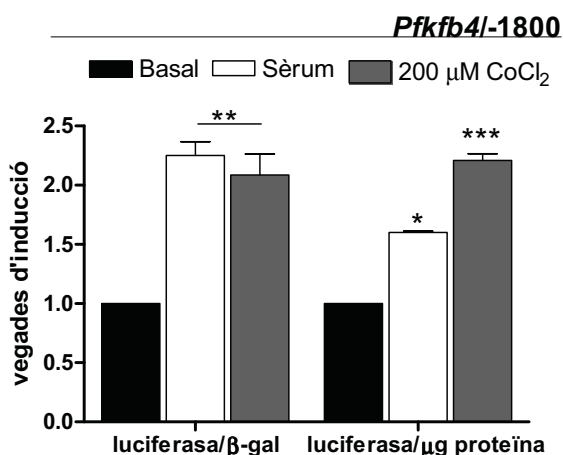
### Resposta dels plasmidis d'expressió luciferasa al tractament amb clorur de cobalt.

Per estudiar si la resposta que s'havia trobat a nivell de proteïna tPFK-2 (PFKFB4) podria estar relacionada amb una regulació a nivell transcripcional del gen *Pfkfb4* pel factor HIF1, ens vam fixar en l'anàlisi detallat de la seqüència de la regió promotora del gen *Pfkfb4*. Els resultats obtinguts prèviament amb l'anàlisi de la regió 5' amb diversos programes informàtics, demostraven la presència de set possibles elements de resposta a hipòxia (HRE), aquests elements tenen una homologia amb el nucli de la seqüència consens del 100%; essent 5'- **CGTG** -3' la seqüència dels HRE localitzats en el promotor del gen *Pfkfb4* a les posicions -404, -492, -943, -1036, -1229, -2200 i -2890 respecte l'inici de transcripció, tal com es mostra a la Figura 2.15.



**FIGURA 2.15. Posicions i seqüències dels elements HRE en el promotor *Pfkfb4*.** Esquema dels fragments del promotor del gen *Pfkfb4* amb les posicions HRE 5'-**CGTG** 3' (-400, -492, -943, -1036, -1229, -2200 i -2890) marcades per un rombe lila. A sota es mostra la taula amb les posicions i seqüències dels elements HRE presents en el promotor *Pfkfb4*. En negreta i majúscula es mostra la seqüència consens HRE mentre que els nucleòtids adjacents es mostren en minúscula. (+) cadena *forward*, (-) cadena *reverse*.

Es va fer una primera aproximació d'anàlisi del promotor transfectant les cèl·lules GC-1 spg amb la construcció *Pfkfb4*/-1800 del promotor que conté possibles elements HRE a: -1229, -1036, -943, -492 i -404, per determinar si responia a un tractament d'hipòxia produït amb  $\text{CoCl}_2$ . Després de la transfecció es va iniciar un tractament de 16 hores amb 10% de sèrum (com a control positiu de resposta) i amb  $\text{CoCl}_2$  a 200  $\mu\text{M}$ . Amb l'extracte de cèl·lules obtingut es va mesurar l'activitat luciferasa i es van corregir els resultats amb els corresponents valors de proteïna i de  $\beta$ -galactosidasa. Els resultats que es recullen a la Figura 2.16, mostraven unes dues vegades d'inducció com a resposta al tractament d'hipòxia.



**FIGURA 2.16. Resposta de la construcció *Pfkfb4*/-1800 a la hipòxia.** Les cèl·lules GC-1 spg es van transfectar transitòriament amb la construcció del promotor *Pfkfb4*/-1800 i es van mantenir amb normòxia (basal), sèrum (10%) o incubades durant 16 h en presència de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$ . Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la construcció sense tractar que s'agafa com a 1. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de proteïna i de  $\beta$ -galactosidasa. Es representa la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  S.E. (\*)=( $P < 0.05$ ), (\*\*)=( $P < 0.01$ ) i (\*\*\*)=( $P < 0.001$ ).

Seguidament es va dur a terme una anàlisi més detallada provant les dues línies de cèl·lules espermatogèniques, GC-1 spg (espermatogoni) i GC-2 spd (ts) (espermatòcit) amb diverses construccions del promotor *Pfkfb4*. Els resultats, que es mostren a la Figura 2.17, s'expressen com a vegades d'inducció d'activitat luciferasa del plasmidi estudiat, sota el tractament hipòxic, respecte al nivell basal d'activitat de la mateixa construcció sense tractar, en condicions de normòxia, a qui se li assignava el valor de 1. Per poder comparar entre les diferents construccions del promotor, es van corregir els resultats per l'eficiència de transfecció de cada construcció amb els corresponents valors de  $\beta$ -galactosidasa.

Pel que fa a la hipòxia produïda pel clorur de cobalt ( $\text{CoCl}_2$ ) a les cèl·lules GC-1spg (Figura 2.17A), les construccions del promotor *Pfkfb4*/-2100, *Pfkfb4*/-1800, *Pfkfb4*/-1077, i *Pfkfb4*/-428, van respondre positivament de l'ordre de 2 i 3 vegades d'inducció respecte el valor basal. Aquestes dades



semblarien indicar que l'element HRE localitzat a la posició de -404 i present en el fragment de promotor de -428 nucleòtids podria ser suficient per induir una resposta a la hipòxia als espermatogonis. Així els elements de resposta localitzats a -492, -493, -1036 semblarien no tenir un paper significatiu donat que no hi ha una variació significativa en la inducció observada quan hi són presents respecte de quan s'eliminen. El fet que la construcció *Pfkfb4*/-166 no presenti resposta al tractament hipòxic sembla reforçar aquest resultat doncs aquesta construcció ja no presenta cap seqüència consens per elements HRE.

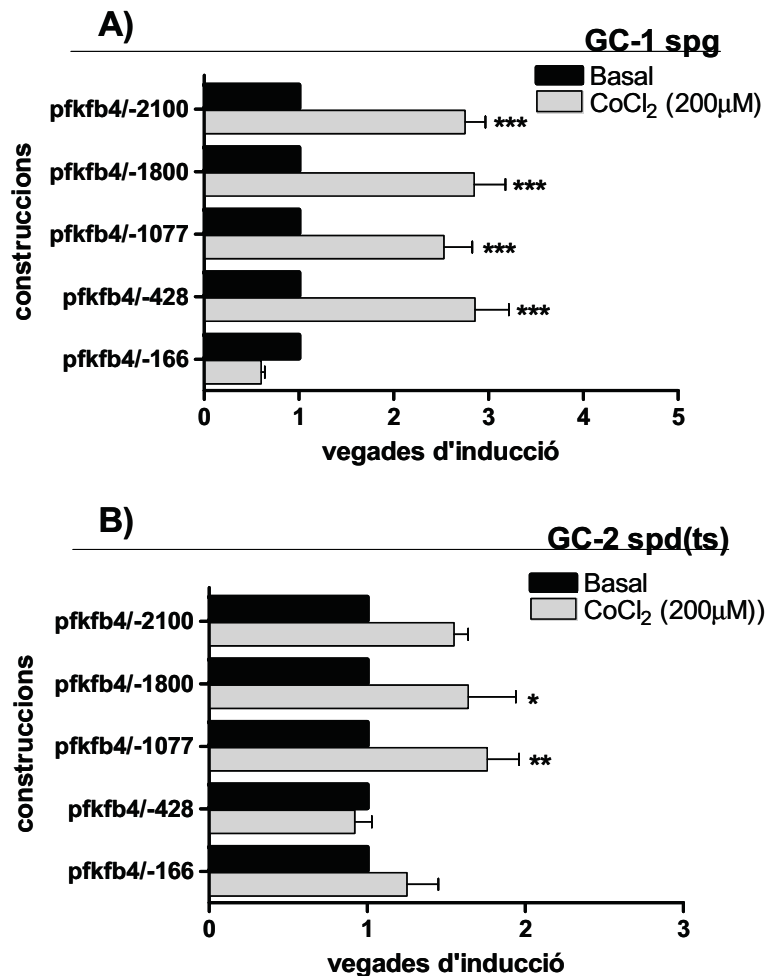


FIGURA 2.17. Activitat luciferasa de les diferents construccions de la regió 5'- del gen *Pfkfb4* com a resposta a la hipòxia química. Les diferents construccions es van transfectar de forma transitòria a les cèl·lules germinals GC-1 spg i GC-2 spd(ts). Les transfeccions es van realitzar com a mínim per triplicat, i es van fer les mitjanes dels valors individuals per a donar el resultat d'un experiment. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la construcció sense tractar que s'agafa com a 1. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de  $\beta$ -galactosidasa. Es representa la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  S.E. (\*)=( $P < 0.1$ ), (\*\*)=( $P < 0.01$ ), (\*\*\*)=( $P < 0.001$ ).

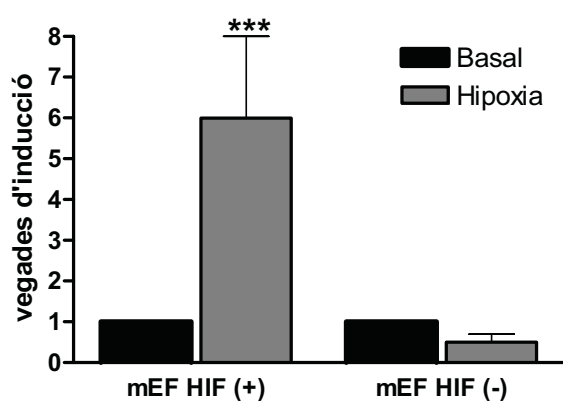
D'altra banda, el tractament amb el clorur de cobalt (CoCl<sub>2</sub>) a les cèl·lules derivades d'espermatòcits GC-2 spd (ts) (Figura 2.17B), va provocar una resposta positiva a les construccions del promotor *Pfkfb4*/-2100, *Pfkfb4*/-1800 i *Pfkfb4*/-1077, però no va donar cap resposta significativa a

la construcció *Pfkfb4*/-428. Això semblaria indicar que l'element HRE present en aquest fragment no tindria un paper determinant en la resposta a la hipòxia en les espermàtides. El fragment *Pfkfb4*/-166 tampoc no va respondre a la hipòxia induïda per  $\text{CoCl}_2$ , fet esperable degut a què en aquesta regió de promotor ja no hi ha cap element consens HRE.

En conjunt, aquests resultats posen de manifest que l'element HRE localitzat a la posició -404 podria ser el més important per conduir un augment de transcripció de *Pfkfb4* en resposta a les baixes pressions d'oxigen als espermatogonis, però la importància d'aquest element no semblaria ser la mateixa en els espermatòcits i es faria necessària la presència dels altres elements HRE per a induir l'activació del gen *Pfkfb4* com a conseqüència de la hipòxia.

### HIF1 $\alpha$ com a mediador de la resposta a la hipòxia del promotor del gen *Pfkfb4*

Tenint en compte els resultats anteriors, i per aprofundir en la possible regulació transcripcional del gen *Pfkfb4* pel factor HIF-1, es va transfectar la construcció *Pfkfb4*/-1077, que conté quatre possibles elements de resposta a hipòxia, a una línia cel·lular salvatge de fibroblasts embrionaris de ratolí (mEF /HIF (+)) i a la mateixa línia deficient en el gen HIF1 (mEF /HIF (-)). Després de la transfecció es van tractar amb  $\text{CoCl}_2$  durant 16 hores i es va analitzar l'activitat luciferasa. Els resultats d'aquest experiment es mostren a la Figura 2.18.



**FIGURA 2.18.** Inducció del promotor del gen *Pfkfb4* en cèl·lules embrionàries de fibroblasts salvatges de ratolí (mEF HIF (+)) o cèl·lules mEF delecionades pel factor HIF1 $\alpha$  (mEF HIF (-)). La construcció *Pfkfb4*/-1077, amb quatre seqüències consens per HRE, es va transfectar de forma transitòria a les cèl·lules mEF HIF(+) i mEF HIF (-). Després d'incubar 16h en condicions basals (normòxia) o en presència de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  (hipòxia) es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la construcció sense tractar que s'agafa com a 1. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de  $\beta$ -galactosidasa. Es representa la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  S.E. La barra que porta (\*\*\*)=( $P < 0.001$ ) és estadísticament diferent respecte el seu basal i respecte la mateixa condició a les cèl·lules deficientes.

Com s'esperava, després de transfectar la construcció del promotor a les cèl·lules mEF salvatges (mEF HIF(+)) i exposar-les a condicions d'hipòxia, l'activitat luciferasa mesurada va

incrementar-se de manera significativa (fins a sis vegades respecte el basal). En canvi, en transfectar la construcció a les cèl·lules mEF deficientes pel factor HIF1 $\alpha$  (mEF HIF(-)) i després d'incubar amb CoCl<sub>2</sub> durant 16 hores, l'activitat luciferasa mesurada no va experimentar cap increment significatiu.

Els resultats obtinguts apunten a la necessitat del factor HIF 1 $\alpha$ , en forma activa, com a mediador de la resposta del gen *Pfkfb4* al microambient hipòxic dels túbuls seminífers. Aquests resultats concorden amb els publicats per Minchenko i col·laboradors al 2004, on demostraven que el gen *Pfkfb4* s'indueix en condicions d'hipòxia a diferents línies tumorals via HIF1 $\alpha$ . Aquests resultats s'estan completant amb transfeccions de les construccions de *Pfkfb4* inferiors a -1077 a les cèl·lules mEF/HIF (+) i mEF /HIF(-) per tal de poder acotar més i determinar quina de les quatre possibles seqüències consens HRE juga un paper clau. Així mateix, per tal d'acabar de concretar quin és l'HRE important, es realitzaran experiments de mutacions puntuals en la seva seqüència i finalment, es farà un EMSA utilitzant com a sonda la seqüència de l'element HRE més probable per tal de demostrar la unió directa del factor HIF 1 en aquella regió promotora.

## SP-1.

El factor de transcripció Sp-1 pertany a la família dels factors de transcripció *Sp1-like* (Dyanan and Tjian, 1983a; Dynan and Tjian, 1983b). Tots els membres d'aquesta família contenen a la regió C-terminal tres *Zinc-fingers* conservats, per on s'uneixen al DNA. Sp-1 reconeix seqüències riques en caixes GC (GGGGCGGGG) o GT (GGTGTGGGG) com a llocs d'unió en els gens diana, actuant com a factor de transcripció basal (Mastrangelo et al., 1991; Su et al., 1991). Aquestes seqüències estan presents en nombrosos promotors i altres seqüències reguladores tant de gens d'expressió ubiqua com d'expressió específica de teixit (Suske, 1999). Les regions que limiten amb les caixes GC i/o GT són molt heterogènies i podrien ser llocs d'unió d'altres factors de transcripció importants. Diversos estudis (Gerber et al., 1995; Li et al., 1991; Pugh and Tjian, 1990; Schaufele et al., 1990; Seipel et al., 1992) han demostrat que el factor Sp-1 pot interaccionar amb altres factors de transcripció o amb els cofactors veïns per modular de forma coordinada l'activitat transcripcional dels seus gens diana. Per exemple, pot interactuar amb components del complex de transcripció basal: TAFs (*TATA-box protein associated factors*) (Thomas et al., 2007). D'aquesta manera Sp1 adquiriria especificitat a l'hora d'activar la transcripció dels gens diana.

Malgrat ser una proteïna expressada de forma ubiqua, s'ha comprovat en embrions de ratolí que la seva expressió pot variar segons l'etapa del desenvolupament i segons els tipus cel·lulars. Els

seus nivells més elevats es troben a les cèl·lules del sistema hematopoietic en desenvolupament, a les cèl·lules fetals i a les cèl·lules germinals masculines (Zhao and Meng, 2005). Aquesta distribució li assignaria un possible paper específic en els processos de desenvolupament embrionari, així com un paper més general en el creixement i diferenciació cel·lular (Saffer et al., 1991). En els ratolins knockouts pel gen Sp-1, els embrions homozigots Sp1<sup>-/-</sup> presenten un retard en el desenvolupament i acaben per morir el dia 11 de gestació, destacant doncs la importància del factor Sp1 per la correcta progressió de l'embriogènesi (Marin et al., 1997).

A les cèl·lules espermatogèniques de ratolí, s'han trobat diferents trànscrips de Sp-1, els quals s'expressen a les diferents cèl·lules germinals durant l'espermatogènesi (Persengiev et al., 1996; Thomas et al., 2005). Així doncs, trobem dos trànscrips (de 8.8 i 8.2 Kb) que codifiquen per a una proteïna d'elevat pes molecular (110 kDa) similar a la proteïna que trobem a les cèl·lules somàtiques i que es localitza als espermatogonis A i B i a les cèl·lules de la fase mitòtica. S'han descrit quatre trànscrips més de menor grandària: 4.1, 3.7, 3.2 i 2.5 Kb, els quals codifiquen per a dues proteïnes de diferent pes molecular; 90 i 60 KDa, respectivament. Totes dues presenten patrons d'expressió que se solapen al llarg de l'espermatogènesi, encara que s'incrementa l'expressió dels seus trànscrips a la fase meiòtica, en especial als espermatòcits paquitens (Taula 2). Lee i col·laboradors (Lee et al., 2006) han demostrat que la presència del factor de transcripció Sp1 en el transcriptoma és important per a l'activació de gens, com per exemple el gen que codifica per la proteïna Lactat deshidrogenasa-c (LDH-C) (Yang and Thomas, 1997), a les cèl·lules germinals de manera diferencial segons la fase de l'espermatogènesi i el tipus cel·lular.

Kba	KDa	Tipus cel·lular	Referències
8.8	110	Espermatogoni A i B, Fase mitòtica	Persengiev et al, 1995; 1996
8.2			
4.1	90	Fase meiòtica	Thomas et al, 2005
3.7			
3.2	60	Fase meiòtica	
2.5			

**TAULA 2.2. Patró d'expressió dels trànscrips del factor Sp1 a les cèl·lules espermatogèniques.** La primera columna indica la mida dels trànscrips en kilobases (kb), la segona columna indica la mida de la proteïna per la que codifiquen en kilodaltons (kDa), la tercera columna indica a quin tipus cel·lular o a quina fase de l'espermatogènesi s'expressen de forma majoritària.

S'ha trobat també que Sp-1 és un dels factors de transcripció que es modulen per hipòxia (Cummins and Taylor, 2005). Alguns dels gens models de resposta a hipòxia, com poden ser EPO, VEGF o COX-2, presenten seqüències d'unió pel factor Sp1 en els seus promotors. En aquests promotors, Sp1 actuaria com un cofactor transcripcional, facilitant l'activació transcripcional dels gens diana en condicions hipòxiques (Koshiji et al., 2004; Koshiji et al., 2005; Shi et al., 2001). D'altra banda, s'ha demostrat un increment en la translocació de Sp1 al nucli cel·lular en resposta a la hipòxia

(Lee et al., 2004a; Lee et al., 2004b; Miki et al., 2004b; Sanchez-Elsner et al., 2004; Xu et al., 2000). La interacció entre els dos factors de transcripció (Sp1 i HIF) té lloc pel domini Per/Arnt/Sim (PAS) de la proteïna HIF1 $\alpha$ , tal com es representa a la Figura 2. 19.

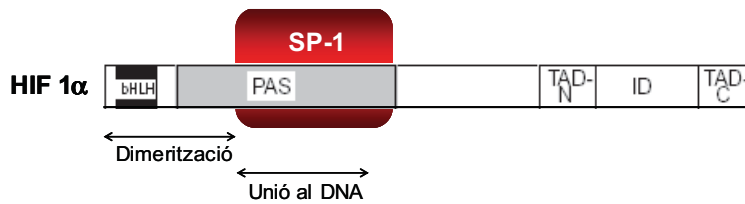


FIGURA 2. 19. Esquema de la interacció entre els factors de transcripció HIF 1 $\alpha$  i Sp-1. Modificat de Semenza, 2001b.

### Efectes del factor Sp1 en la regulació transcripcional del gen *Pfkfb4*.

En primer lloc es va fer una anàlisi de la seqüència del promotor *Pfkfb4* per determinar les regions riques en GC que s'ajustaven a la consens de Sp1 5'-GGGGCGGG-3', localitzant-se fins a 15 d'aquestes seqüències que tal com es mostra a la Figura 2.20 estaven repartides al llarg dels primers 2000 nucleòtids del promotor.

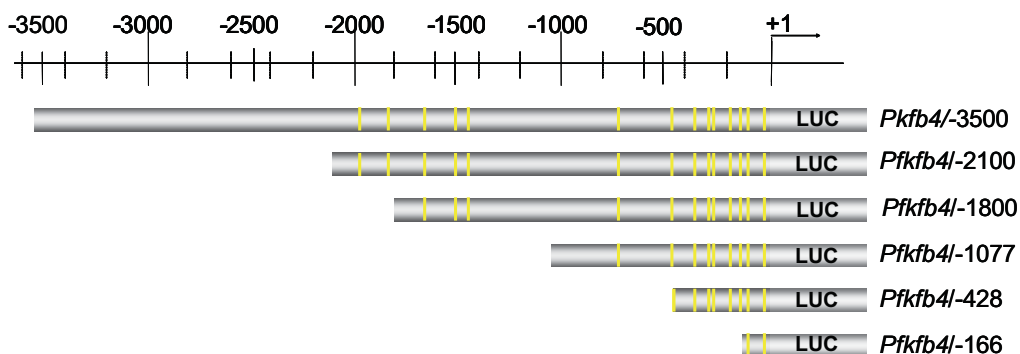
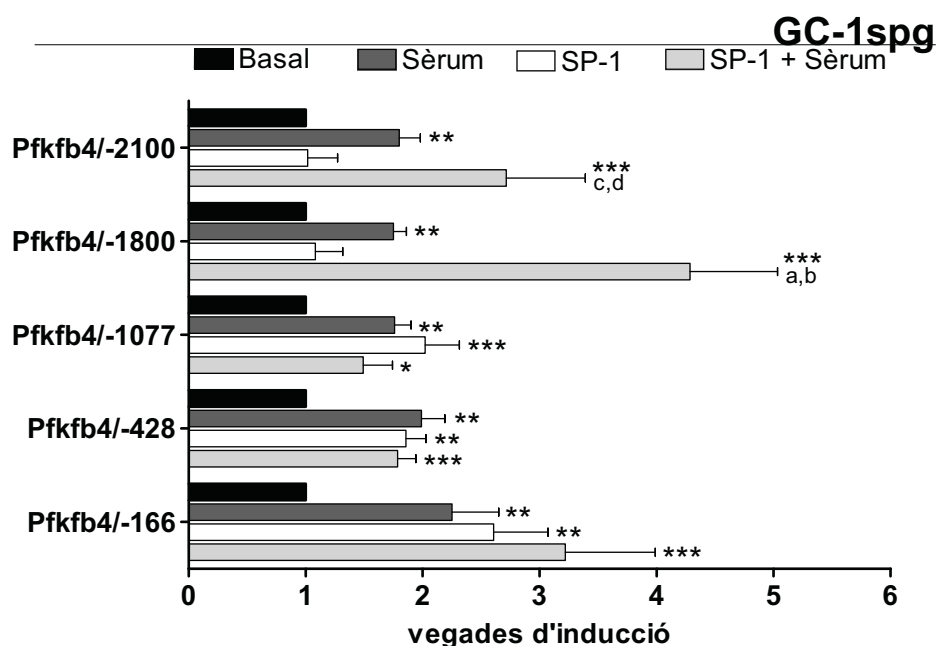


FIGURA 2.20. Esquema dels fragments del promotor del gen *Pfkfb4* amb les posicions GC-box marcades 5'-GGGGCGGG 3' (-53,-118, -137, -191, -272, -303, -375, -456, -739, -1465, -1473, -1502, -1688, -1850, -1996). L'element GC-box es representa amb una línia vertical groga.

Per tal d'avaluar el possible efecte que pugués produir el factor de transcripció Sp1 sobre l'expressió del gen *Pfkfb4*, es van cotransfectar transitòriament les cèl·lules germinals GC-1 spg amb 1 $\mu$ g de les construccions del promotor *Pfkfb4*, descrites anteriorment, i 0.5  $\mu$ g del vector d'expressió pel factor Sp1 o del vector pGL2basic buit. A continuació s'incubaven les cèl·lules amb presència de sèrum (10%) o sense. Els efectes exercits per aquests tractaments, durant 16 hores, es mostren com a vegades d'inducció de l'activitat relativa de la luciferasa del plasmidi assajat sota els tractaments, respecte al nivell basal d'activitat de la mateixa construcció sense tractament (a qui se li va donar el

valor de 1). Per poder comparar entre les diferents construccions es van corregir els resultats per la seva corresponent activitat  $\beta$ -galactosidasa.



**FIGURA 2.21. Resposta de les construccions del promotor *Pfkfb4* al factor de transcripció Sp1.** Activitat luciferasa de cèl·lules GC-1 spg cotransfectades amb les diferents construccions del promotor i amb Sp1 sense tractar i tractades amb 10% sèrum. Es van fer un mínim de tres experiments independents amb triplicats. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la construcció sense tractar que s'agafa com a 1. Per tal de transfectar la mateixa quantitat de DNA a totes les condicions, les construccions del promotor *Pfkfb4* en situacions basals es cotransfectaven amb el vector pGL2basic buit. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de  $\beta$ -galactosidasa. Es representa la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  S.E. Diferències significatives respecte les condicions: Basal: (\*)=( $P<0.05$ ), (\*\*)=( $P<0.01$ ), (\*\*\*)=( $P<0.001$ ). Sèrum: (a)=( $P<0.001$ ), (c)=( $P<0.05$ ). Sp1: (b)=( $P<0.001$ ), (d)=( $P<0.05$ ).

Els resultats que es recullen a la Figura 2.21 mostren que per a les cèl·lules GC-1 spg, la presència del factor de transcripció Sp1 augmentava l'activitat luciferasa de les tres construccions més petites del promotor *Pfkfb4* respecte el seu basal no cotransfectat. Així per exemple a la construcció *Pfkfb4*-166 considerada com a promotor mínim, ja que conté els primers 141 pb de la regió 5'- des de l'inici de transcripció crucials per la transcripció específica a testicle del gen *Pfkfb4* humà (resultats presentats anteriorment a la Figura 2.10), la cotransfecció amb el factor Sp1 incrementava l'activitat luciferasa entre 2.5 i 3 vegades respecte el seu basal no cotransfectat. I a les construccions *Pfkfb4*-428 i *Pfkfb4*-1077 també s'incrementava l'activitat luciferasa, al voltat de dos vegades més respecte el basal no transfectat. En aquestes mateixes tres construccions l'efecte del sèrum va ser semblant, amb valors de luciferasa d'entre 2-3 vegades d'inducció. En analitzar l'efecte de la sobreexpressió de Sp1 en presència de sèrum, no es va obtenir cap diferència respecte als valors aconseguits individualment per cadascuna de les condicions per separat, descartant un possible sinergisme en la resposta. En canvi, curiosament per a les construccions més grans: *Pfkfb4*-

1800 i *Pfkfb4*-2100, el factor Sp1 per si mateix no semblava activar la transcripció del gen *Pfkfb4*, però en comparar els efectes de Sp1 en presència de sèrum, la transcripció s'incrementava entre 3 i 4 vegades respecte a les dues vegades d'inducció del sèrum sol, indicant, aquí sí, un possible efecte sinèrgic del sèrum i Sp1.

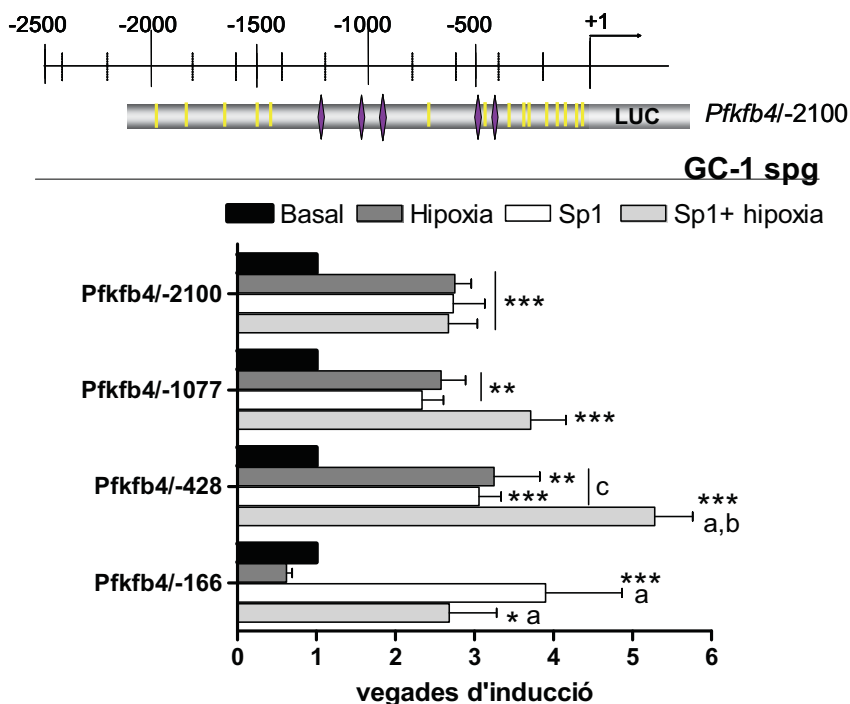
Aquests resultats indiquen que la regió dels 141 primers nucleòtids, on es localitza la unitat mínima promotora, podria tenir caixes importants per mediar la resposta a Sp1 a les cèl·lules espermàtiques amb independència dels factors presents en el sèrum. En canvi, la regió compresa entre els fragments *Pfkfb4*-1077 i *Pfkfb4*-2100, i que és comuna als fragments *Pfkfb4*-1800 i *Pfkfb4*-2100, tot i presentar caixes GC que podrien mediar la resposta a Sp1 per elles soles, la presència del factor Sp1 no activa al promotor. Però, al sumar l'efecte del tractament amb sèrum s'observaven diferències respecte als valors d'inducció trobats només en presència de sèrum o només en presència del factor Sp1, es tractaria doncs, d'un efecte additiu.

### **Possible cooperació entre el factor de transcripció Sp1 i la hipòxia.**

Els resultats presentats fins ara, mostraven la presència de diverses possibles seqüències d'unió a Sp1 i al factor induïble per hipòxia HIF-1 (HRE) a la regió 5'- del gen *Pfkfb4*, les quals semblarien ser bones candidates per ser activades en presència d'aquests factors. A la bibliografia ja s'han demostrat indicis de cooperació entre els factors de transcripció HIF 1 i Sp1, per exemple pel gen VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) el qual presenta llocs d'unió a Sp1 propers a l'inici de transcripció i a llocs HRE funcionals. En aquest cas, Sp1 en cooperació amb HIF1 augmentaria la resposta transcripcional d'aquest gen sota condicions hipòxiques (Shi et al., 2001).

Per tal d'aprofundir en la possible relació de tots dos factors en l'activació transcripcional del gen *Pfkfb4*, es va cotransfectar transitòriament les construccions del promotor: *Pfkfb4*-166, *Pfkfb4*-428, *Pfkfb4*-1077 i *Pfkfb4*-2100, juntament amb el factor Sp1 (1 µg, que representa el doble de quantitat que a l'anterior experiment) o amb el vector pGL2basic buit, a la línia cel·lular germinal GC-1 spg (espermatogoni). Després de la transfecció dels diferents plasmidis, les cèl·lules es van sotmetre, durant 16 hores, al tractament amb clorur de cobalt per simular l'efecte de la hipòxia. Amb l'extracte cel·lular obtingut es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats mostrats a la Figura 2.22 s'expressen com a vegades d'inducció d'activitat luciferasa del fragment de promotor estudiat, cotransfectat amb el factor Sp1 sota el tractament hipòxic, respecte al nivell basal d'activitat de la mateixa construcció sense factor Sp1 i en condicions de normòxia, a qui se li assignava el valor de 1. Per poder comparar

entre les diferents construccions del promotor es corregeixen els resultats per l'eficiència de transfecció de cada construcció amb els corresponents valors de  $\beta$ -galactosidasa.



**FIGURA 2.22. Resposta de les construccions del promotor *Pfkfb4* al factor de transcripció Sp1 en condicions d'hipòxia.** Activitat luciferasa de cèl·lules GC-1 spg transfectades amb les diferents construccions del promotor i cotransfectades amb Sp-1, en condicions de normòxia i/o hipòxiques (200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>). Es van fer un mínim de tres experiments independents amb triplicats. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la construcció sense tractar que s'agafa com a 1. Per tal de transfectar la mateixa quantitat de DNA a totes les condicions, les construccions del promotor *Pfkfb4* en situacions basals es cotransfectaven amb el vector pGL2basic buit. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de  $\beta$ -galactosidasa. Es representa la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  S.E. Diferències respecte la condició basal: (\*)=(P<0.05), (\*\*)=(P<0.01), (\*\*\*)=(P<0.001). Diferències respecte la condició hipòxica: (a)=(P<0.001). Diferències respecte la condició amb Sp1: (b)=(P<0.01). Diferències respecte la condició amb Sp1+Hipòxia: (c)=(P<0.05).

Segons els resultats representats a la Figura 2.22, en cotransfectar el factor de transcripció Sp1 (1 $\mu$ g) s'incrementava l'activitat luciferasa per a qualsevol de les quatre construccions del promotor *Pfkfb4* en condicions basals (normòxia i sense sèrum), entre dos i quatre vegades. Aquests valors obtinguts eren més alts que els anteriors resultats (mostrats a la Figura 2.21), degut, possiblement, a la major quantitat de DNA del factor Sp-1 cotransfectat (1  $\mu$ g en aquest experiment versus 0.5  $\mu$ g en l'experiment anterior).

Com ja s'havia vist amb els anteriors experiments, en repetir el tractament amb CoCl<sub>2</sub>, es va observar que la hipòxia sola augmentava l'activitat luciferasa a les construccions *Pfkfb4*/-428, *Pfkfb4*/-1077 i *Pfkfb4*/-2100, obtenint-se valors entre 2 i 4 vegades d'inducció respecte el valor basal. Així mateix, la construcció *Pfkfb4*/-166 no presentava cap resposta a hipòxia degut a què en aquesta zona del promotor no hi ha cap element consens HRE. Indicant que l'element HRE situat a -404 seria el millor candidat per mediar la resposta a hipòxia del gen *Pfkfb4* en aquestes condicions.



Si s'efectuen els dos tractaments anteriors de forma conjunta: sobreexpressar Sp1 en condicions d'hipòxia, únicament la construcció *Pfkfb4*-428 va presentar diferències significatives d'aquest tractament en comparació amb cada tractament de manera independent (cotransfecció de Sp1 o hipòxia).

A partir d'aquestes dades es podria inferir que el factor Sp1 estaria afavorint o augmentant l'activació del promotor del gen *Pfkfb4* a les cèl·lules germinals que ja es dona en situacions d'hipòxia. La construcció *Pfkfb4*-428, presenta un element HRE localitzat a la posició -404, per tant la resposta additiva de la presència de Sp1 en hipòxia s'hauria de buscar en l'existència de caixes GC al voltant de la regió de -404, que podrien afavorir la possible interacció entre els dos factors de transcripció per modular l'activitat transcripcional del gen *Pfkfb4*, a la Figura 2.23 es mostra un esquema de les caixes implicades.

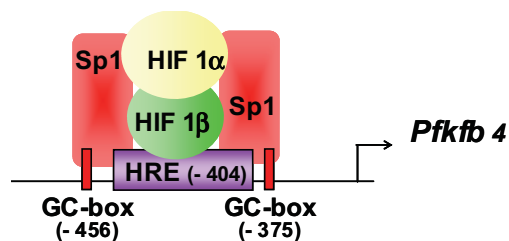


FIGURA 2. 23. Esquema de l'element HRE localitzat a la posició -404 i les caixes GC que l'envolten (-375 i 456) i que podrien afavorir una possible interacció entre les proteïnes HIF1 i Sp1.

### c-MYC.

c-Myc és un protooncogen que s'indueix per factors de creixement a les cèl·lules normals, mentre que a les cèl·lules transformades o tumorals s'expressa de forma constitutiva. Codifica per a un factor de transcripció de la família bàsic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-LZ). Gràcies a la dimerització amb la proteïna Max, c-Myc s'uneix a la regió de DNA 5'- CACGTG -3', coneguda com a *E-box*, per contribuir a l'activació transcripcional dels gens diana. D'altra banda, també pot inhibir la transcripció quan s'acomplexa amb altres factors transcripcionals com són les proteïnes Miz1 o Sp1 i s'uneixen als elements iniciadors dels promotors dels gens diana (Gordan et al., 2007a; Gordan et al., 2007b).

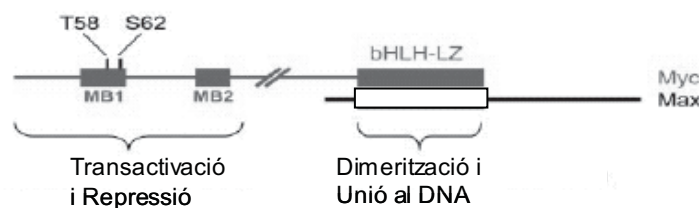


FIGURA 2.24. Estructura de les proteïnes c-Myc i Max. Modificat d'Amati, 2004.

L'expressió del factor de transcripció c-Myc és característica de cèl·lules altament proliferatives, i s'apaga quan les cèl·lules entren en un estat de quiescència que acompanya als últims estadis de diferenciació. S'ha descrit la presència de c-Myc al testicle, concretament als espermatogonis B, quan es troben a la última fase de la divisió mitòtica (Wolfes et al., 1989) i als espermatòcits primaris, a la profase de la meiosi (Teng and Vilagrasa, 1998). Ambdós tipus cel·lulars són altament proliferants.

c-Myc regula el creixement i la proliferació cel·lular, controla el metabolisme, la síntesi de macromolècules i l'apoptosi. És important en processos de proliferació cel·lular i també en el desenvolupament embrionari normal mitjançant la modulació dels seus gens diana involucrats en l'adhesió cel·lular, la proliferació, el creixement i el metabolisme. A més de promoure la biogènesi mitocondrial i la respiració també indueix gens codificants pels enzims de la via glucolítica, des dels transportadors de glucosa fins a la PKM i la LDH-A, actuant sobre els elements E-box en els promotors dels gens diana, com per exemple Lactat deshidrogenasa A, en fibroblats i/o cèl·lules NIH3T3 (Kim et al., 2004; Osthus et al., 2000; Shim et al., 1997). Així també, mitjançant transferència gènica de fetges de ratolins amb adenovirus que sobreexpressen c-Myc, s'incrementa l'expressió d'aquests gens glucolítics *in vivo* (Osthus et al., 2000) afavorint el pas de glucosa cap a piruvat i la formació de lactat. Per tant, en presència de c-Myc es mantindria una elevada proliferació cel·lular, ja que c-Myc proporciona els canvis metabòlics necessaris per afavorir la via glucolítica, que mantindrà els nivells d'ATP (actuant sobre gens com Glut-1, HK-2, GAPDH, i LDH-A, entre altres (Kim et al., 2004)). També afavoreix l'increment de la massa i de l'activitat mitocondrial (via el factor TFAM i incrementant el metabolisme del ferro) per tal de fabricar els substrats biosintètics necessaris (com aminoàcids, poliamines, àcids nucleics) per fer les proteïnes de nova síntesi (Gordan et al., 2007b).

Existeix la hipòtesi que c-Myc i HIF1 podrien actuar conjuntament en la regulació transcripcional dels seus gens diana ja que les seqüències dels seus elements de resposta coincideixen parcialment; sent 5'-CACGTG -3' per c-Myc i 5'- G/ACGTGC -3' per HIF1. De fet, 22 dels 107 HRE llistats a la revisió publicada per Wenger i col·laboradors (2005), es corresponen a E-boxes. En resposta a la hipòxia, el factor HIF 1 desplaçaria c-Myc del lloc d'unió al DNA, regulant negativament l'activitat transcripcional de c-Myc i, per tant, suprimint els seus efectes fisiològics (Kim et al., 2004). Per tant, c-Myc seria responsable de la regulació dels gens diana en situacions de normòxia, mentre que en situacions on la pressió d'oxigen es veïés disminuïda seria HIF 1 qui controlaria l'expressió dels gens diana, com a resultat del desplaçament de la unió de c-Myc al promotor (Gordan et al., 2007b).

## Efectes del factor c-Myc en la regulació transcripcional del gen *Pfkfb4*.

Tenint en compte la importància del factor de transcripció c-Myc a la regulació gènica dels sistemes proliferants es va analitzar la seqüència promotora del gen *Pfkfb4* en busca de possibles seqüències d'unió a c-Myc o E-box (Figura 2.25). Es van trobar fins a 8 possibles seqüències d'unió, d'aquestes només dues són 100% homòlogues amb la seqüència E-box (5'-CACGTG-3') consensus. De la resta, dues estan descrites a la bibliografia com a seqüències E-box no canòniques però que c-Myc pot reconèixer i unir. Es tractarien de les seqüències localitzades a -404 i a -2023, que també es troben en dos gens glucolítics: gliceraldehid fosfat deshidrogenasa (GAPD) i Topoisomerasa-1 (TP11) a humà i ratolí. Tanmateix, molts dels gens glucolítics presenten seqüències E-box canòniques conservades entre espècies (humans i ratolins), tant a la regió promotora com al primer exó, on c-Myc s'uneix (Kim et al., 2004).

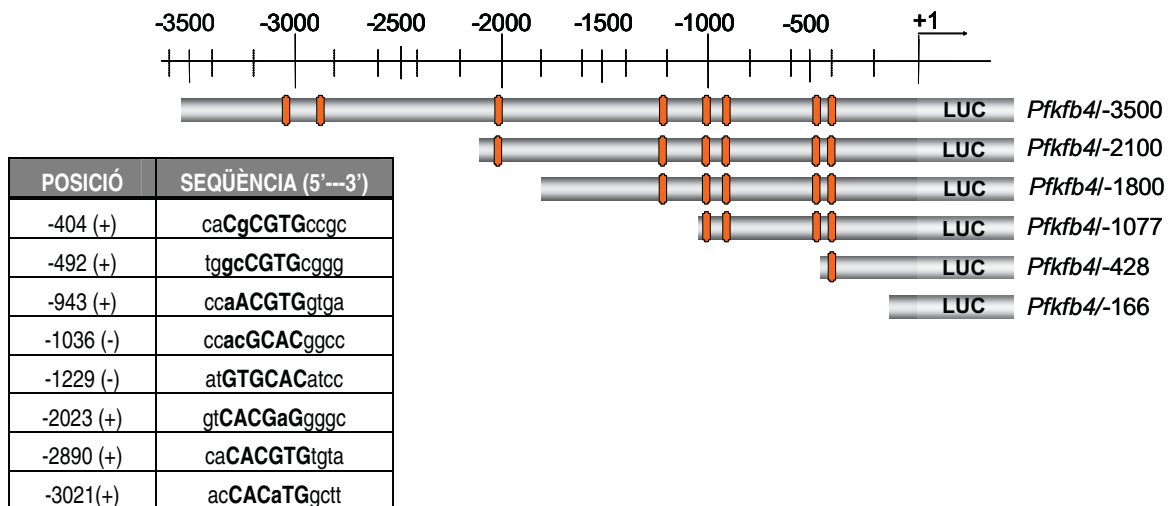
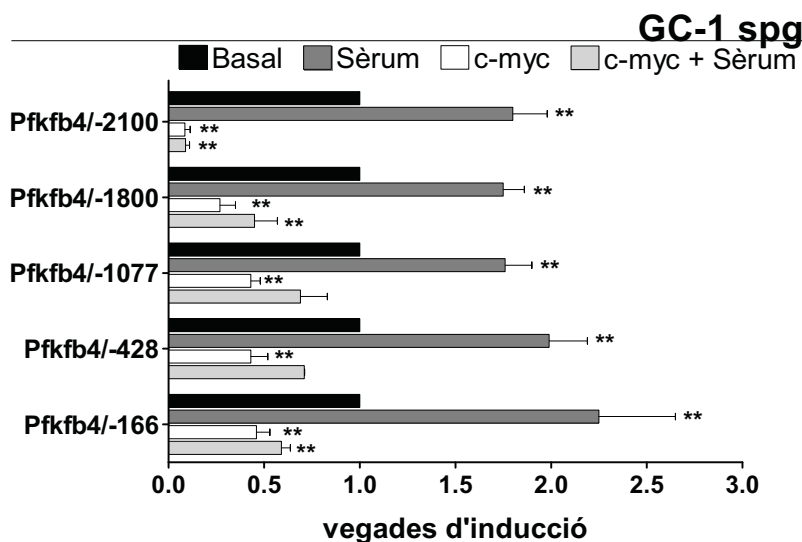


FIGURA 2.25. Esquema dels fragments del promotor del gen *Pfkfb4* amb les posicions de les E-Box 5'-caCGTG 3' (-406, -492, -943, -1036, -1229, -2023, -2890 i -3021) marcades. Els elements E-box es representen per un cilindre vertical de color taronja.

Amb la finalitat d'avaluar els possibles efectes de c-Myc sobre el promotor de *Pfkfb4*, es va dur a terme una anàlisi de cotransfecció del factor c-Myc amb els diferents fragments del promotor per tal d'avaluar quina resposta provoca la seva sobreexpressió sobre l'activació de l'expressió del gen *Pfkfb4*. Amb aquest propòsit es van cotransfectar transitòriament les cèl·lules germinals GC-1 spg amb les construccions del promotor *Pfkfb4*, descrites anteriorment, i el factor c-Myc o el vector pGL2basic buit. Es van incubar les cèl·lules amb presència de sèrum (10%) o sense. A la Figura 2.26 es mostren els efectes exercits per aquests tractaments, durant 16 hores, com a vegades d'inducció de l'activitat relativa de la luciferasa del plasmidi assajat sota els tractaments, respecte al nivell basal d'activitat de la mateixa construcció sense tractament (a qui se li va donar el valor de 1). Per poder comparar entre

les diferents construccions es van corregir els resultats per la seva corresponent activitat  $\beta$ -galactosidasa.

A les cèl·lules espermatogèniques GC-1 spg, com ja s'havia comentat anteriorment, el tractament amb sèrum va activar la resposta luciferasa de totes les construccions i ho va fer del mateix ordre, al voltant de dos vegades de inducció respecte el valor basal. La presència del factor de transcripció c-Myc va reduir l'activitat luciferasa a totes les construccions del promotor *Pfkfb4* (Figura 2.26). A la construcció *Pfkfb4*/-166, considerada com a promotor mínim, el factor c-Myc també li va disminuir l'activitat luciferasa al 50% respecte el seu basal. L'efecte repressor de c-Myc en presència de sèrum no es va contrarestar. La construcció major: *Pfkfb4*/-2100, és la que va presentar els valors de inhibició de la transcripció més alts. En aquesta construcció el factor c-Myc provoca una reducció en l'activitat relativa de la luciferasa del 90% respecte la condició basal, amb independència del sèrum.



**FIGURA 2.26. Resposta de les construccions del promotor *Pfkfb4* al factor de transcripció c-Myc.** Activitat luciferasa de cèl·lules GC-1 spg cotransfectades amb les diferents construccions del promotor i amb c-Myc, sense tractar i tractades amb 10% sèrum. Es van fer un mínim de tres experiments independents amb triplicats. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la construcció sense tractar que s'agafa com a 1. Per tal de transfectar la mateixa quantitat de DNA a totes les condicions, les construccions del promotor *Pfkfb4* en situacions basals es cotransfectaven amb el vector pGL2basic buit. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de  $\beta$ -galactosidasa. Es representa la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  S.E. (\*\*)=( $P < 0.01$ ).

Aquests resultats indicarien que els possibles elements de resposta a c-Myc presents en el promotor a les posicions -409, -1229 i -2023 podrien ser funcionals, és a dir que c-Myc en aquest cas es podria unir a elles per regular, negativament, l'expressió del gen *Pfkfb4*. Es faria necessari, però, la realització com a mínim d'un EMSA amb la seqüència de l'element o elements *E-box* candidats com a oligo per tal de demostrar la unió directa del factor c-Myc a aquella regió promotora.

## Possible interacció entre c-Myc i la hipòxia en la regulació de la transcripció de *Pfkfb4*

C-Myc i HIF 1 podrien reconèixer seqüències que mantinguessin una homologia del 100% amb el core de les seves respectives seqüències consens, E-box: 5'-CACGTG-3' per c-Myc i HRE: 5'-CGTG-3' per HIF1. En el promotor del gen *Pfkfb4* es van trobar fins a sis seqüències 5'-CGTG-3' amb un 100% d'homologia localitzades a les posicions -404, -492, -943, -1036, -1229 i -2890, que es mostren a la Figura 2.27. Algunes d'elles ja s'han descrit com a possibles elements de resposta a un i/o a l'altre factor al llarg d'aquest capítol (resultats anteriorment mostrats a les Figures 2.15 i 2.25).

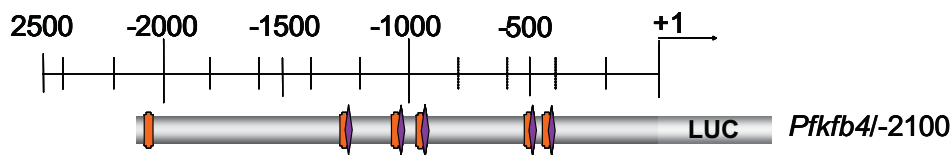


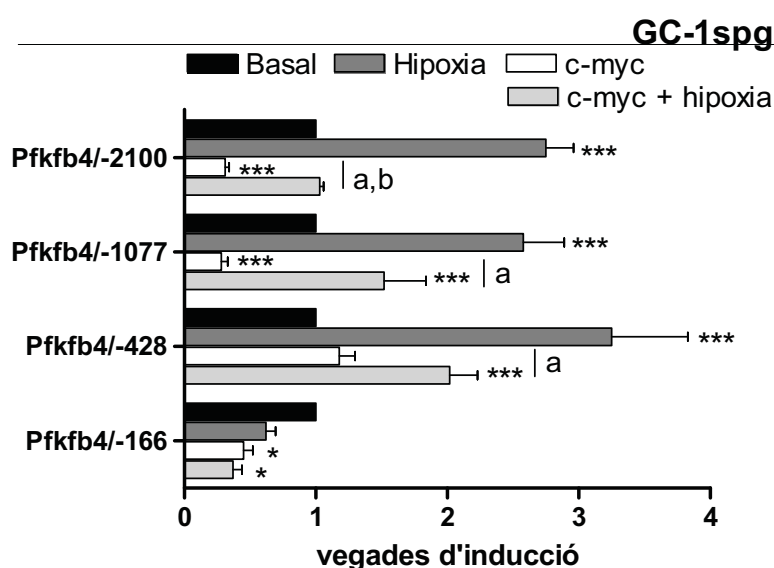
FIGURA 2.27. Esquema de les posicions de les possibles caixes E-Box -5'-caCGTG 3-' i HRE 5'-CGTG 3 (-406, -492, -943, -1036, -1229 i -2023) susceptibles de ser reconegudes tant per c-Myc com per HIF1. Els elements E-box es representen per un cilindre vertical de color taronja i els elements HRE per un rombe lila.

Per a examinar si podria existir una relació de tots dos factors en la regulació transcripcional del gen *Pfkfb4*, es van cotransfectar transitòriament les construccions del promotor *Pfkfb4/-166*, *Pfkfb4/-428*, *Pfkfb4/-1077* i *Pfkfb4/-2100*, juntament amb el factor c-Myc o el vector pGL2basic buit, a la línia cel·lular germinal GC-1 spg (espermatogoni). Després de la transfecció dels diferents plasmidis, les cèl·lules es van sotmetre, durant 16 hores, al tractament amb clorur de cobalt per mimetitzar químicament l'efecte de la hipòxia. Amb l'extracte cel·lular obtingut es va mesurar l'activitat luciferasa. El resultat mostrat a la Figura 2.28 s'expressa com a vegades d'inducció d'activitat luciferasa del plasmidi estudiat, cotransfectat amb el factor c-Myc sota el tractament hipòxic, respecte al nivell basal d'activitat de la mateixa construcció sense factor c-Myc en condicions de normòxia, a qui se li va donar el valor de 1. Per poder comparar entre les diferents construccions del promotor, es van corregir els resultats per l'eficiència de transfecció de cada construcció amb els corresponents valors de  $\beta$ -galactosidasa.

Com ja s'ha descrit, en cotransfectar les diferents construccions del promotor *Pfkfb4* i el factor de transcripció c-Myc en condicions basals es va reduir al 50% l'activitat luciferasa respecte les obtingudes amb la corresponent construcció *Pfkfb4* sola (Figures 2.26 i 2.28). Així mateix, el tractament amb la hipòxia química sola, induïda pel clorur de cobalt ( $\text{CoCl}_2$ ), va augmentar l'activitat luciferasa a les construccions *Pfkfb4/-428*, *Pfkfb4/-1077* i *Pfkfb4/-2100*, obtenint-se valors entre 2 i 4

vegades d'inducció respecte el valor basal. En canvi, la construcció *Pfkfb4*/-166 no responia a la hipòxia degut a què en aquesta zona del promotor no hi havia cap element consens HRE.

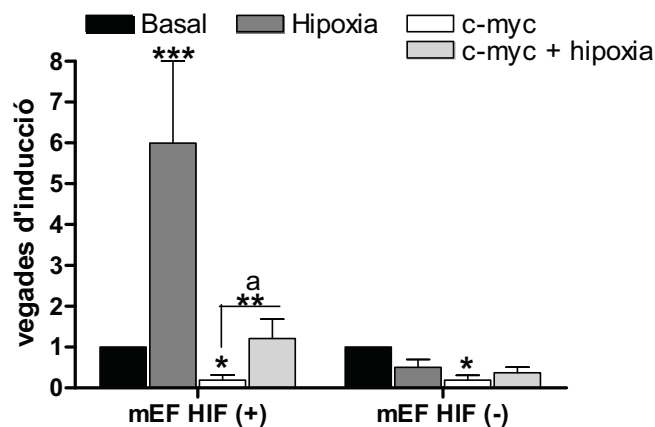
En analitzar el possible efecte de la suma dels dos factors (presència de c-Myc en hipòxia) s'observava que a les construccions *Pfkfb4*/-428, *Pfkfb4*/-1077 i *Pfkfb4*/-2100 les activitats luciferases es veien incrementades, per sobre les obtingudes en la cotransfecció de c-Myc. Es sobrepassava parcialment la inhibició transcripcional produïda pel factor c-Myc, però en cap cas s'arribava a sobrepassar els valors de les induccions que s'aconseguien només amb el tractament amb  $\text{CoCl}_2$ . Pel que fa a la construcció *Pfkfb4*/-166 la resposta de la cotransfecció de c-Myc en situació d'hipòxia és similar a la obtinguda en normòxia.



**FIGURA 2. 28. Resposta de les construccions del promotor *Pfkfb4* al factor de transcripció c-Myc en condicions d'hipòxia.** Activitat luciferasa de cèl·lules GC-1 spg transfectades amb les diferents construccions del promotor i cotransfectades amb c-Myc, en condicions de normòxia i/o hipòxia (200  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ ). Es van fer un mínim de tres experiments independents amb triplicats. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la construcció sense tractar que s'agafa com a 1. Per tal de transfectar la mateixa quantitat de DNA a totes les condicions, les construccions del promotor *Pfkfb4* en situacions basals es cotransfectaven amb el vector pGL2basic buit. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de  $\beta$ -galactosidasa. Es representa la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  S.E. Diferències respecte la condició basal: (\*)=( $P < 0.05$ ), (\*\*\*)=( $P < 0.001$ ). Diferències entre c-Myc i c-Myc + hipòxia: (a)=( $P < 0.01$ ). Diferències respecte la condició hipòxica: (b)=( $P < 0.01$ ).

Aquests resultats assenyalarien que en els ambients hipòxics, quan la proteïna HIF 1 és activa, la inhibició transcripcional que es podria produir per unió de c-Myc es contrarestaria parcialment, possiblement com a conseqüència d'un desplaçament de c-Myc de la unió a la seqüència promotora del gen *Pfkfb4* per competència, pel mateix lloc d'unió, amb HIF 1 $\alpha$ . Aquesta situació es donaria a les construccions de més de 166 nucleòtids. En canvi, la resposta d'aquesta construcció no es diferencia entre situacions de normòxia o hipòxia, ja que en no tenir HRE a la seva seqüència no s'esperaria resposta positiva a la hipòxia.

Per a investigar més a fons sobre la possible relació dels factors c-Myc i HIF1 $\alpha$  en la regulació transcripcional del gen *Pfkfb4*, es va cotransfectar la construcció *Pfkfb4*-1077, que conté 4 elements 100% homòlegs amb el *core* bàsic compatible amb llocs d'unió HRE i c-Myc de (*core* seqüència: 5'-CGTG-3') i el factor c-Myc i/o el vector buit pGL2bàsic (per la condició basal) a la línia cel·lular de fibroblasts embrionaris de ratolí salvatge (mEF /HIF (+)) i la seva corresponent deficient en el gen HIF1 (mEF /HIF (-)). Després de la transfecció, les cèl·lules es van tractar amb CoCl<sub>2</sub> durant 16 hores i es va analitzar l'activitat luciferasa. Els resultats d'aquest experiment es mostren a la Figura 2.29.



**FIGURA 2.29. Resposta del promotor *Pfkfb4* al factor de transcripció c-Myc en condicions d'hipòxia.** La construcció *Pfkfb4*-1077 (amb quatre seqüències 5'-CGTG-3' susceptibles de ser reconegudes per HIF1 i c-Myc) es va cotransfectar transitòriament amb el factor de transcripció c-Myc a les cèl·lules mEF HIF(+) i mEF HIF (-). Després de 16h d'incubació en condicions basals (normòxia) o amb 200  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub> (hipòxia) es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la construcció sense tractar que s'agafa com a 1. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de  $\beta$ -galactosidasa. Es representa la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  S.E. (\*) (P<0.05), (\*\*) (P<0.01) i (\*\*\*) (P<0.001). Diferències respecte la condició hipòxica (a)=(P<0.001).

A les cèl·lules mEF salvatges (mEF HIF(+)) o a les mEF deficientes (mEF HIF(-)), el factor c-Myc també reduïa l'activitat luciferasa del promotor del gen *Pfkfb4* respecte l'obtinguda en normòxia, obtenint-se valors propers al 75% d'inhibició transcripcional. Després d'exposar a les cèl·lules mEF HIF(+) i les mEF HIF(-) a la hipòxia química, l'activitat luciferasa s'incrementava a les cèl·lules salvatges, revertint-se la inhibició produïda per c-Myc. Mentre que a les cèl·lules deficientes pel factor de transcripció HIF1 $\alpha$  es continuava produint la inhibició transcripcional del gen *Pfkfb4*. No obstant, la resposta del promotor sol a la hipòxia a les cèl·lules mEF HIF(+) va ser molt major que l'obtinguda per la cotransfecció.

Segons aquests resultats es podria pensar que HIF 1 $\alpha$  competiria amb c-Myc per unir-se a les mateixes seqüències d'unió al promotor, malgrat que només s'assoleixen nivells d'expressió semblants a la condició basal. En situacions d'hipòxia, c-Myc estaria frenant l'efecte de la transcripció del gen

*Pfkfb4*, perquè els resultats d'inducció són molt majors en situacions d'hipòxia sola que en presència del factor c-Myc. No obstant, per poder assegurar un possible efecte competitiu s'haurien de realitzar anàlisis amb més detall, com la possibilitat de comparar un efecte diferencial en variar la càrrega de proteïna c-Myc present a les cèl·lules. Apart, també s'hauria d'evaluar l'efecte sobre les altres construccions del promotor.

### Possible relació entre els factors de transcripció HIF 1 $\alpha$ , Sp1 i c-Myc

Està descrit que en resposta a la hipòxia Sp1 s'uneix a HIF1 $\alpha$  per augmentar l'afinitat d'aquest factor pels llocs d'unió al promotor i, conseqüentment, desplaçar a c-Myc del promotor (Gordan et al., 2007b; Kaluz et al., 2003). D'altra banda, Parisi i col·laboradors (2007) mitjançant l'anàlisi de la seqüència promotora de gens amplificats a l'atzar localitzats en els cromosomes 21 i 22 humans, han descrit que les posicions per sobre de 1.5 kb del lloc d'inici de transcripció (TSS) són riques tant en llocs d'unió a Sp1 com a c-Myc. I que on més es concentren és en els 500 pb més propers al TSS. Aquestes regions solen estar conservades evolutivament entre espècies: humans i ratolins i/o humans i rates (Parisi et al., 2007). Aquestes dades podrien suggerir una possible interacció entre els factors c-Myc, HIF 1 $\alpha$  i Sp-1 al promotor dels gens diana per regular la seva expressió, tal com ja està descrit per alguns dels gens que regulen la proliferació cel·lular com, seria el cas de Ciclina D1 o de p21 (Gordan et al., 2007b).

Donat que el promotor del gen *Pfkfb4* humà presenta possibles llocs d'unió en la seva seqüència per als tres factors (Figura 2.30), es va procedir a estudiar si a les cèl·lules germinals GC-1 spg (espermatogonis) es podia donar alguna possible cooperació entre els factors de transcripció HIF1 $\alpha$  i Sp1 que pogués contrarestar la regulació negativa fins ara observada del gen *Pfkfb4* per c-Myc.

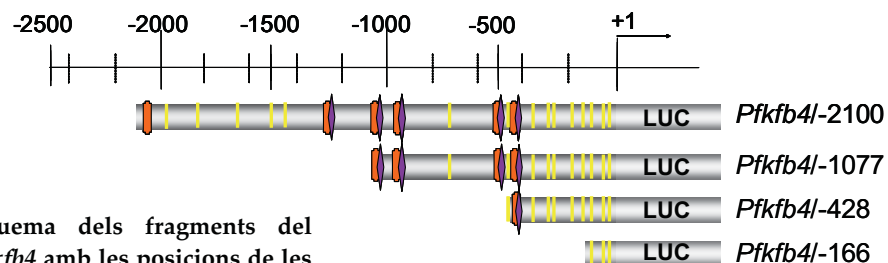


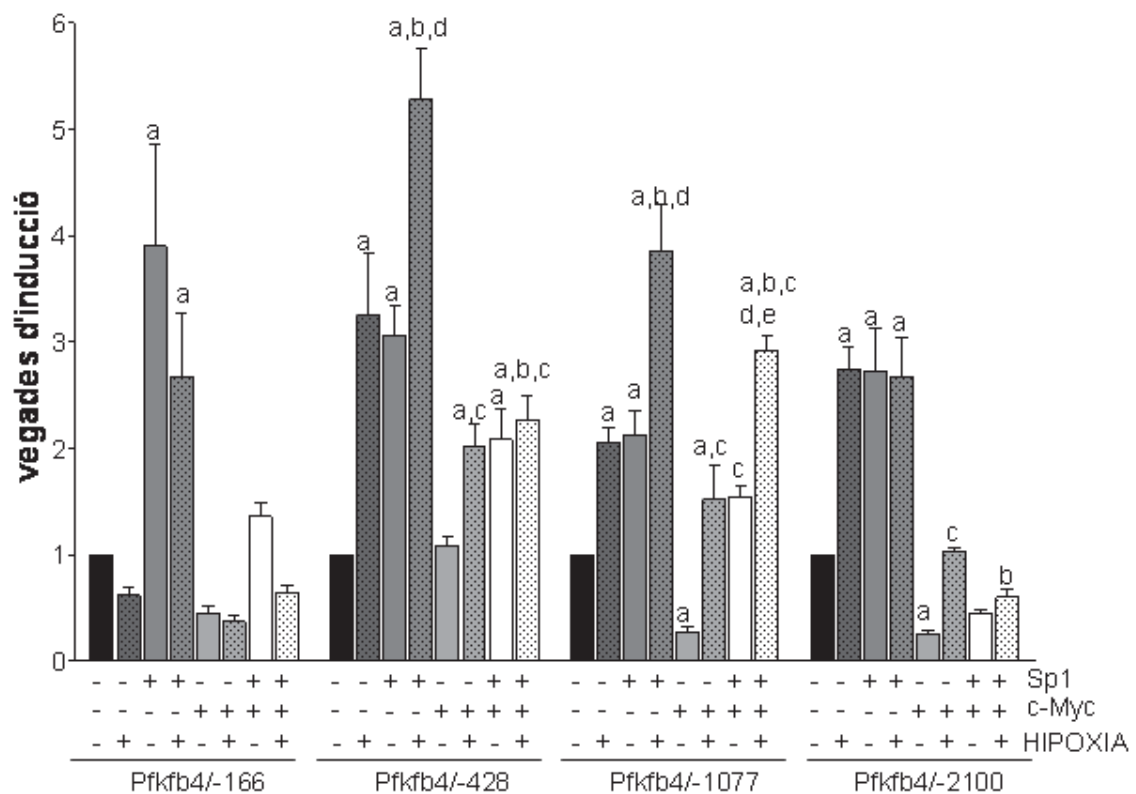
FIGURA 2.30. Esquema dels fragments del promotor del gen *Pfkfb4* amb les posicions de les HRE (lila), E-box (taronja) i Sp1 (groc) marcades.

Amb aquest propòsit es van cotransfectar transitòriament les cèl·lules GC-1 spg amb les construccions del promotor *Pfkfb4*/-166, *Pfkfb4*/-428, *Pfkfb4*/-1077 i *Pfkfb4*/-2100, juntament amb els



factors c-Myc i Sp-1 sols, tots dos alhora, o amb el vector pGL2basic buit en els casos on es volia compensar la quantitat de DNA total transfectat. El resultat de les transfeccions es mostra a la Figura 2.31.

Després de la transfecció de les diferents construccions, les cèl·lules es van sotmetre, durant 16 hores, al tractament amb clorur de cobalt. Amb l'extracte cel·lular obtingut es va mesurar l'activitat luciferasa. El resultat s'expressa com a vegades d'inducció d'activitat luciferasa del plasmidi estudiat, cotransfectat amb els factors c-Myc i/o Sp1 en condicions basals o sota el tractament hipòxic, respecte al nivell basal d'activitat de la mateixa construcció sense els factors de transcripció i en normòxia, a qui se li va assignar el valor de 1. Per poder comparar entre les diferents construccions del promotor, es van corregir els resultats per l'eficiència de transfecció de cada construcció amb els corresponents valors de  $\beta$ -galactosidasa.



**FIGURA 2.31. Resposta del promotor *Pfkfb4* als factors de transcripció c-Myc o Sp1 en condicions d'hipòxia.** Es van transfectar les construccions *Pfkfb4*/-166, *Pfkfb4*/-428, *Pfkfb4*/-1077 i *Pfkfb4*/-2100 amb el vector pGL2basic buit, o amb els factors de transcripció c-Myc i Sp-1 a les cèl·lules germinals GC-1 spg. Després de 16h d'incubació en normòxia o amb 200  $\mu$ M de  $\text{CoCl}_2$  (hipòxia) es va mesurar l'activitat luciferasa. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la construcció sense tractar que s'agafa com a 1. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de  $\beta$ -galactosidasa. Es representa la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  S.E. Diferències estadísticament significatives: (a) respecte el basal ( $P < 0.001$ ), (b) respecte la hipòxia (totes  $P < 0.001$  excepte *Pfkfb4*/-1077 que és  $P < 0.05$ ), (c) respecte la presència de c-Myc ( $P < 0.001$ ), (d) respecte la presència de Sp1 ( $P < 0.001$ ), (e) respecte la presència de Sp1+ c-Myc ( $P < 0.001$ ).

La construcció *Pfkfb4*/-166 presentava fins a 4 cops d'inducció en presència de Sp1. Quan es sumava l'efecte de la hipòxia (sobreeexpressió de Sp1 més hipòxia) només s'aconseguien 2 cops d'inducció. Tot i reduir-se a la meitat la resposta, les diferències entre elles no van ser significatives. Com ja hem vist amb els anteriors resultats, la hipòxia sola no va produir efectes en aquesta construcció ja que no presenta caixes HRE. D'altra banda, la presència de c-Myc va reduir l'activitat luciferasa fins a un 50% del basal, essent similar la resposta que s'obtenia en normòxia i en hipòxia. Amb la cotransfecció doble, Sp1 i c-Myc, es va aconseguir revertir l'efecte inhibitori de c-Myc sobre el promotor, encara que no es va arribar als mateixos nivells d'estimulació aconseguits per Sp1 sol, ja que els resultats van ser del mateix ordre que els basals. A més, en aquesta construcció la hipòxia tornava a reduir la resposta luciferasa per sota del basal.

A les construccions *Pfkfb4*/-428 i *Pfkfb4*/-1077 també es va incrementar l'activitat luciferasa en resposta a la hipòxia i en resposta al factor Sp1, entre tres i dos vegades, respectivament. La resposta del promotor als dos estímuls a l'hora va duplicar-se, suggerint un efecte additiu de tots dos estímuls. El factor c-Myc en normòxia a la construcció *Pfkfb4*/-428 no va produir cap efecte significatiu i presentava valors semblants als basals. Però a la construcció *Pfkfb4*/-1077 va reduir la resposta luciferasa significativament respecte el basal. Amb la hipòxia i c-Myc, no es va arribar a obtenir valors d'inducció com els que es van aconseguir amb el tractament de CoCl<sub>2</sub> sol. Amb la cotransfecció doble de Sp1 i c-Myc era major la resposta que s'aconseguia amb la hipòxia, sobretot a la construcció *Pfkfb4*/-1077 que arribava fins a les tres vegades d'inducció respecte la condició basal. No obstant, en cap cas es va obtenir les mateixes induccions que amb les cotransfeccions simples, aquest fet indicaria que es podria tractar d'un desplaçament parcial de la unió de c-Myc al promotor per part de HIF i que Sp-1 l'afavoriria.

Per a la construcció *Pfkfb4*/-2100, el tractament d'hipòxia sola li va augmentar l'activitat luciferasa tres vegades d'inducció (P<0.001). Aquest mateix increment es va aconseguir amb la cotransfecció amb Sp1 (P<0.001). En sumar l'efecte dels dos tractaments (hipòxia i la presència de Sp1) no s'observava cap efecte additiu i les induccions continuaven sent de tres vegades la basal (P<0.001). Respecte la cotransfecció amb el factor de transcripció c-Myc, es va reduir l'activitat luciferasa a un 50% de l'activitat basal. En sumar-hi l'efecte del tractament d'hipòxia es va aconseguir revertir aquest efecte i retornar a una activitat luciferasa semblant a la basal. Finalment, en aquest cas ni amb la cotransfecció conjunta de Sp1 i c-Myc ni a l'intentar sumar els tres efectes (hipòxia, presència de Sp1 i presència de c-Myc) es va aconseguir revertir la inhibició feta per c-Myc.

Resumint, en cotransfectar les construccions del promotor *Pfkfb4* juntament amb els factors Sp1 i c-Myc s'observava que l'efecte inhibitori de c-Myc (aconseguint resultats de luciferasa similars als nivells basals o inclús menors) per les construccions *Pfkfb4*/-166, *Pfkfb4*/-428 i *Pfkfb4*/-1077 es

podia eliminar. En sumar-li a la presència de Sp1 i c-Myc l'efecte de la hipòxia, només van aconseguir-se resultats significatius ( $P < 0.001$ ) per a la construcció *Pfkfb4/-1077*. Partint de la hipòtesi d'un efecte negatiu de c-Myc sobre el promotor del gen *Pfkfb4* humà, almenys per la construcció *Pfkfb4/-1077* tant la sobreexpressió de Sp1 com la hipòxia podrien contrarestar aquesta inhibició i a més conjuntament cooperar per aconseguir induccions encara majors.

## DISCUSSIÓ

L'enzim PFK-2/FBPasa-2 és essencial en la regulació de la via glucolítica i per tant és important conèixer com es regula la seva expressió gènica. Per aquesta raó, la primera part d'aquest capítol s'ha centrat en l'estudi de la regió 5'- del gen *Pfkfb4*.

En primer lloc es va identificar l'inici de transcripció del gen, trobant que es correspon amb un residu citosina localitzat en la posició -25 a partir del codó ATG, passant a ser considerada la posició +1 del gen *Pfkfb4* humà. Seguidament, es van clonar dos fragments de la regió promotora, un de més de 3500 nucleòtids i un altre de 1077 nucleòtids *upstream* de l'ATG al vector d'expressió luciferasa pGL2basic (*Pfkfb4/-3500* i *Pfkfb4/-1077*, respectivament). A partir d'aquestes construccions, i per deleccions creixents, es va obtenir una bateria de fragments de la regió promotora: *Pfkfb4/-2100*, *Pfkfb4/-1077*, *Pfkfb4/-428* i *Pfkfb4/-166*. I una última, *Pfkfb4/-428Δ(-166)*, amb una delecció de 166 nucleòtids al seu extrem -3'. Amb totes aquestes construccions es va identificar la regió mínima del promotor que requereix el gen per transcriure's, demostrant que com a mínim els primers 141 pb de la regió 5'- del gen són essencials per la transcripció del gen *Pfkfb4* humà.

Paral·lelament, es va analitzar la seqüència de la regió de -3500 nucleòtids a la cerca de possibles llocs d'unió consens per a factors de transcripció.

El testicle és un òrgan amb una alta taxa proliferativa, degut a l'elevada producció d'espermatozoides i a la renovació dels espermatogonis. Tanta proliferació requereix, de ben segur, molta energia i una gran quantitat d'oxigen. Però, els vasos sanguinis es localitzen entre els túbuls seminífers, per tant, degut a la distància de difusió entre la zona basal i el lumen tubular, la pressió parcial d'oxigen es redueix (Wenger and Katschinski, 2005). És ben conegut que sota baixes tensions d'oxigen, el factor de transcripció HIF  $1\alpha$  s'activa, activant al seu torn, un ampli ventall de gens induïbles per hipòxia gràcies a la heterodimerització amb la proteïna HIF  $1\beta$  i la unió d'aquest heterodímer als elements de resposta, HRE, en el promotor dels seus gens diana, els quals abasten

un gran ventall de processos biològics. Així hi ha gens que van des de la proliferació i la supervivència cel·lular a l'apoptosi o la motilitat, l'estructura del citoesquelet, l'eritropoiesi, l'angiogènesi i, fins i tot, el metabolisme anaeròbic (Hirota and Semenza, 2006).

Els resultats obtinguts de l'anàlisi de 3500 nucleòtids del promotor del gen *Pfkfb4* evidencien la presència de possibles elements de resposta a hipòxia que podrien explicar la inducció en condicions d'hipòxia que s'ha descrit pel gen *Pfkfb4* tant en diferents òrgans com en diferents línies tumorals (Minchenko et al., 2003; Minchenko et al., 2004; Minchenko et al., 2005a; Minchenko et al., 2005c). En el model cel·lular d'espermatogoni, mitjançant assajos de luciferasa amb les construccions del promotor en condicions d'hipòxia, es va posar de manifest que la resposta a hipòxia es mantenia fins la construcció *Pfkfb4*/-428, i s'havia perdut per la *Pfkfb4*/-166, indicant que l'element HRE al voltant de la posició -400 podria ser el més important o crític. I en canvi, el fet d'ampliar la regió del promotor, és a dir augmentar la seqüència fins a les posicions -1077 i -2100 no semblaven contribuir a la resposta a hipòxia. Així doncs, en principi els putatius HRE d'aquestes regions (posicions -492, -943, -1036 i -1229) aparentment no tindrien un pes específic important, donat que el promotor respon igual tant si els té que si no els té.

No obstant, aquests elements sí caldria tenir-los en compte en el model cel·lular d'espermatòcit, GC-2 spd (ts), on les construccions de major grandària (*Pfkfb4*/-1077, *Pfkfb4*/-1800 i *Pfkfb3*/-2100) sí que responien a la hipòxia mentre que la construcció *Pfkfb4*/-428 no ho va fer.

La implicació del factor HIF1 $\alpha$  en la resposta del promotor a la hipòxia es va corroborar transfectant la construcció *Pfkfb4*/-1077 a la línia cel·lular de fibroblast de ratolí, mEF, on el gen que codifica per HIF1 $\alpha$  es troba deletat (Seagroves et al., 2001). Degut a la pèrdua d'aquesta proteïna, la construcció *Pfkfb4*/-1077 no va respondre a la hipòxia produïda pel tractament amb CoCl<sub>2</sub> en les cèl·lules *knock out* per HIF-I. En canvi, la mateixa construcció transfectada a les cèl·lules mEF salvatges produïa una inducció en la resposta a la hipòxia de fins a 6 vegades respecte el basal. Es demostraria, per tant, la necessitat de la subunitat HIF1 $\alpha$  activa per a mediar la resposta del gen *Pfkfb4* a les baixes pressions d'oxigen que hi ha en l'epiteli seminífer.

D'altra banda, s'ha descrit que HIF 1 $\alpha$  pot regular gens que responen a la hipòxia antagonitzant amb la oncoproteïna Myc per interaccions proteïna-proteïna (Gordan et al., 2007b; Kim et al., 2007) al competir per llocs d'unió similars. A més, s'ha vist que el factor de transcripció Sp1 (d'expressió constitutiva) pot modular les unions de HIF 1 $\alpha$  i c-Myc en el promotor dels gens diana en condicions d'hipòxia, ja que actuaria afavorint la unió de HIF1 $\alpha$  al promotor i desplaçant així a c-Myc dels mateixos llocs d'unió al promotor i revertint els efectes d'aquest últim en la transcripció gènica (Figura 2.32).

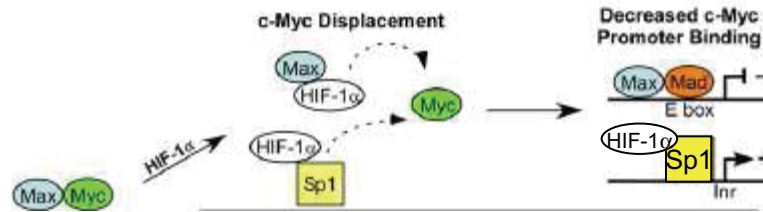


FIGURA 2.32. Model de l'efecte dels factors HIF 1 i Sp1 sobre l'activitat transcripcional de c-Myc en el promotor del gen diana. Adaptat de Gordan et al., 2007a; Gordan et al., 2007b.

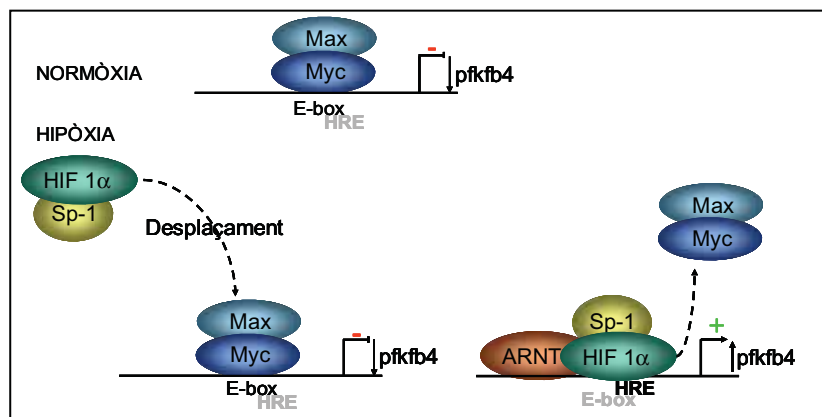
Aquest mateix model es podria hipotetitzar com a possible per al cas del gen *Pfkfb4*. Amb l'anàlisi de la seqüència dels 3500 nucleòtids del promotor del gen *Pfkfb4* s'havien trobat possibles seqüències d'unió que complien tant per la consens de Sp1 com de c-Myc.

Primerament, l'estudi de la resposta del factor Sp1 i de les diferents construccions del promotor en les cèl·lules GC-1 spg, va posar de manifest que la regió dels 141 primers nucleòtids, on es localitzava la unitat mínima promotora, podrien ser importants per mediar la resposta a Sp1 a les cèl·lules espermàtiques. En canvi, tot i tenir possibles caixes d'unió a Sp1 en la regió compresa entre -141 i -2100, cap de les construccions assajades, *Pfkfb4*/-1077, *Pfkfb4*/-1800 i *Pfkfb4*/-2100, per elles soles no semblaven tenir una resposta a la presència de Sp1 en condicions de normòxia. En condicions d'hipòxia les construccions, *Pfkfb4*/-428 i *Pfkfb4*/-1077, que ja presentaven una major resposta a la hipòxia, en afegir Sp1 la resposta s'incrementava molt més aquesta resposta. L'efecte de Sp-1, en col·laboració amb HIF, podria jugar un paper per afavorir l'activació del promotor del gen *Pfkfb4* a les cèl·lules germinals en situacions d'hipòxia.

Pel que fa al protooncogen c-Myc, regulador del creixement i de la proliferació cel·lular, a les cèl·lules espermato gàtiques GC-1 spg la seva presència semblaria inhibir l'activitat luciferasa de les construccions del promotor *Pfkfb4* en normòxia. La hipòxia *per se* tindria poder suficient per revertir aquesta inhibició tot i que la presència de c-Myc impediria arribar als nivells d'estimulació de la hipòxia sola. De confirmar-se de manera inequívoca la inhibició del promotor *Pfkfb4* per c-Myc, es podria pensar que la presència de HIF podria estar provocant un desplaçament de c-Myc de la unió a la seqüència promotora del gen *Pfkfb4* per competència, pel mateix lloc d'unió, amb HIF 1α. Aquesta situació seria plausible per a les construccions de més de 400 nucleòtids, que són aquelles que responien a la hipòxia.

Partint de la base que sigui possible o compatible una relació entre els factors HIF1α, Sp1 i c-Myc a l'hora de regular el gen *Pfkfb4* a les cèl·lules espermato gàtiques en situacions d'hipòxia i

sabent que hi ha diversos treballs que suggereixen que HIF 1 $\alpha$  regula, de forma negativa, a nivell transcripcional l'activitat de c-Myc suprimint els seus efectes fisiològics (Koshiji and Huang, 2004; Koshiji et al., 2004; Koshiji et al., 2005; To et al., 2005), es podria representar mitjançant l'esquema de la Figura 2.33 la possible interacció en el promotor del gen *Pfkfb4*.

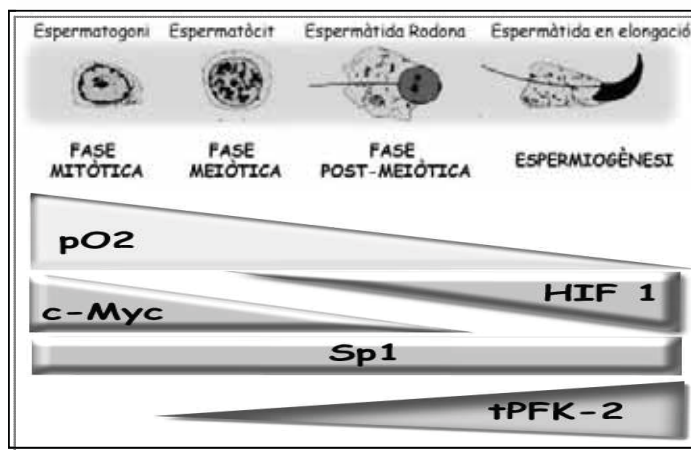


**FIGURA 2.33. Model de les possibles interaccions dels factors transcripcionals HIF, Sp1 i c-Myc per tal de regular l'activitat transcripcional del gen *Pfkfb4*.** En normòxia, c-Myc dimeritzaria amb Max, i aquests s'unirien a les seqüències E-boxes (5'- CACGTG -3') del promotor *Pfkfb4* podent reprimir la seva transcripció. En hipòxia, HIF 1 $\alpha$  es trobaria actiu, s'uniria amb el factor Sp1 i desplaçarien al dímer Myc/Max del promotor. HIF 1 $\alpha$ , amb Sp1, s'uniria a la subunitat ARNT (o HIF 1 $\beta$ ), reconeixerien els llocs HRE del promotor *Pfkfb4* (5'-G/ACGTGC -3') i activarien la seva transcripció. Adaptat de Gordan et al., 2007a; Gordan et al., 2007b.

Segons aquest model ens trobaríem que en situacions de normòxia, la proteïna HIF1 $\alpha$  és hidroxilada i degradada mentre que la proteïna c-Myc dimeritzaria amb la proteïna Max per unir-se a les seqüències E-box en el promotor del gen diana, en aquest cas el gen *Pfkfb4* humà, per reprimir-ne la transcripció. En situacions d'hipòxia, HIF 1 $\alpha$  no seria degradat i podria dimeritzar amb HIF 1 $\beta$  (o ARNT), reconèixer els llocs HRE en el promotor diana i desplaçant, així, el dímer c-Myc/Max del promotor per activar-ne la transcripció. Sp1 actuaria com a cofactor positiu, ajudant a desplaçar el dímer format per c-Myc/Max de la unió amb el promotor.

Aquest tipus d'interacció entre diferents factors és important en la regulació transcripcional a testicle perquè podria explicar el fet de que molts dels enzims glucolítics provinguin de gens específics o de trànscrips específics del llinatge (Eddy, 2002; Goldberg, 1990; Hecht, 1998) i siguin expressats de forma específica durant les fases de l'espermatogènesi. Per exemple, PGK-2, GAPDHs i LDH-C que s'expressen primerament als espermatòcits en fase de paquitè fins a les espermàtides rodones (Goldberg, 1990; Kramer and Erickson, 1981; Welch et al., 2006). El fet que hi hagi molts enzims glucolítics d'expressió específica a les cèl·lules espermatogèniques i als espermatozoides suggereix l'existència d'una fina regulació enzimàtica i d'adaptacions a la hipòxia.

Al llinatge germinal, c-Myc s'expressa en aquelles cèl·lules germinals que es troben en proliferació, espermatogonis i espermatòcit, disminuint de forma progressiva fins a fer-se indetectable a la fase post-meiotica (Koji et al., 1988; Teng and Vilagrasa, 1998; Wolfes et al., 1989). En canvi, HIF 1 $\alpha$  es troba en aquelles cèl·lules germinals que es localitzen més properes al lumen tubular (Marti et al., 2002) i, per tant, la pressió d'oxigen és menor (espermatides i espermatozoides). Sp-1, per la seva banda, presenta una localització més general a les cèl·lules germinals (Persengiev et al., 1996; Thomas et al., 2005). Segons els possibles efectes d'aquests factors en la regulació transcripcional del gen *Pfkfb4*, que s'han resumit en la Figura 2.33, i la distribució cel·lular que presenten durant l'espermatogènesi es podria explicar que la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) es localitzi, principalment, a les cèl·lules germinals postmeiotiques. Es començaria a detectar als espermatòcits i progressaria fins als espermatozoides, segons el model proposat a la Figura 2.34.



**FIGURA 2.34.** Esquema il·lustrant l'expressió temporal de les proteïnes HIF1 $\alpha$ , Sp-1, c-Myc i tPFK-2 durant l'espermatogènesi. Sp-1 és una proteïna d'expressió constitutiva al llarg de l'espermatogènesi, mentre que c-Myc i HIF 1 $\alpha$  presenten una distribució contrària. A mesura que les pressions d'oxigen baixen, en avançar el procés espermatogènic, s'incrementa l'expressió de la proteïna HIF 1 $\alpha$  mentre que l'expressió de c-Myc es redueix. tPFK-2 presenta una distribució paral·lela a HIF-1 $\alpha$  i oposada a c-Myc.





---

**III.**

---

---

**ACCIÓ PARACRINA DE LES CÈL·LULES DE SERTOLI SOBRE PFKFB3 I PFKFB4.**

---

El principal objectiu d'aquest capítol va ser l'estudi dels possibles efectes de les hormones esteroïdals (testosterona i estradiol) sobre l'expressió de l'enzim bifuncional PFK-2/FBPasa-2 en el testicle, on la regulació hormonal és altament important per l'inici i el manteniment del procés espermatogènic.

Per tal d'acomplir-ho, es va abordar l'estudi de la regulació transcripcional del gen *Pfkfb4* a dos nivells. En primer lloc es va iniciar una anàlisi dels possibles efectes directes de la testosterona i/o l'estradiol sobre el promotor del gen *Pfkfb4*. En segon lloc, es va estudiar el possible efecte paracrí de la testosterona sobre els promotors dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* a partir del medi condicionat en les cèl·lules de Sertoli. També es va estudiar aquest possible efecte paracrí sobre les expressions dels enzims uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4). Per aquests estudis es van utilitzar les cèl·lules derivades d'espermatogonis: GC-1 spg, d'espermatòcits: GC-2 spd(ts) i les cèl·lules derivades de Sertoli: TM-4.

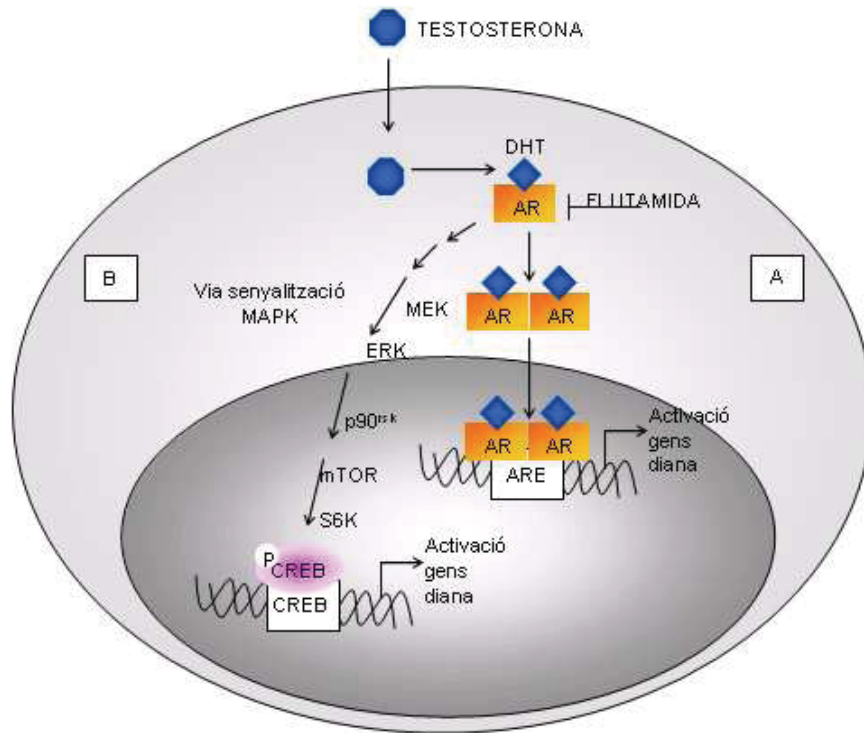
## INTRODUCCIÓ

Malgrat que la testosterona és una hormona essencial per l'inici i el manteniment de la producció dels espermatozoides als mamífers (McLachlan, 2000; McLachlan et al., 2002), les cèl·lules germinals en desenvolupament no en presenten receptors. Per tant, els andrògens no poden actuar directament sobre elles; únicament ho fan sobre les cèl·lules somàtiques del testicle, com són les cèl·lules de Sertoli, les de Leydig, les cèl·lules mioïdes peritubulars i les cèl·lules de la musculatura llisa que envolten els vasos sanguinis (Suarez-Quian et al., 1999). En aquestes cèl·lules, la testosterona interacciona amb el receptor d'andrògens per estimular la producció de factors necessaris per afavorir la maduració de les cèl·lules germinals cap a espermatozoides. Si ens centrem en les cèl·lules de Sertoli, l'hormona actuaria a través dels receptors d'andrògens localitzats a la seva membrana per tal de regular i activar l'espermatogènesi. No obstant, a partir d'aquí el mecanisme pel qual l'estimulació hormonal de testosterona a les cèl·lules de Sertoli influeix sobre les cèl·lules germinals encara roman desconegut.

Al testicle i a la pròstata, la **testosterona** és metabolitzada a 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), la qual té 10 vegades més d'afinitat pels receptors d'andrògens (Debes and Tindall, 2002). En el model clàssic d'interacció entre les hormones esteroïdals i els seus receptors, l'hormona, en aquest cas la testosterona (T), difon a través de la membrana cel·lular, gràcies a les seves característiques hidrofòbiques, per unir-se al seu receptor intracel·lular (AR). Fins aquest moment, el receptor estava inactiu, la unió del lligand amb el receptor permet la formació d'una subunitat hormona-receptor activa. El receptor activat forma un homodímer i tot el complex hormona-receptor transloca al nucli, on funciona com a factor de transcripció que s'uneix a seqüències de reconeixement específiques (elements de resposta als andrògens, ARE) al promotor del gen diana del qual vagi a modular la transcripció (Walker and Cheng, 2005). Així doncs, tant el reconeixement de l'element ARE com la posterior unió al promotor és dependent del lligand, és a dir, de la testosterona.

Però, la testosterona també pot actuar a través d'un mecanisme alternatiu que no impliqui la unió directa del complex hormona-receptor al DNA. En aquest segon model, el complex hormona-receptor activaria vies de senyalització en la cèl·lula que finalment regularien la transcripció dels seus gens diana. Per exemple, el complex hormona-receptor pot activar alguns dels factors implicats en la regulació de via de les MAP cinases (MAPK) per tal d'iniciar la cascada de senyalització que portaria finalment a la fosforilació del factor de transcripció CREB (*cAMP response element binding protein*) que en últim terme seria el responsable de la regulació transcripcional del gen diana (Walker and Cheng, 2005).

En definitiva, l'augment transcripcional i en conseqüència la regulació de la síntesi *de novo* de proteïnes en les cèl·lules que responen als andrògens seria el mecanisme pel qual aquestes hormones controlarien l'espermatogènesi. El model d'interacció entre l'hormona esteroïdal (en aquest cas, la testosterona) i el seu receptor a la cèl·lula diana es mostra a l'esquema de la Figura 3.1.



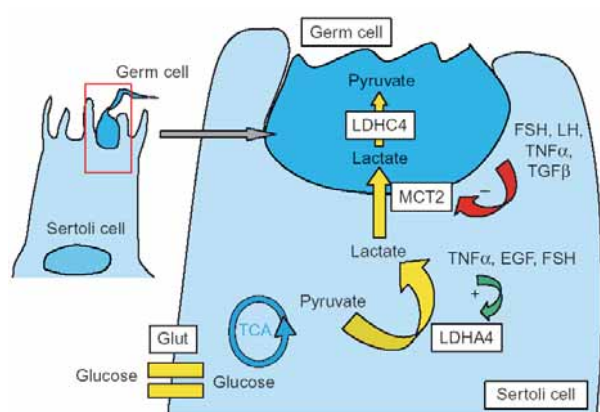
**FIGURA 3. 1. Representació esquemàtica de l'activació transcripcional dels gens en resposta als andrògens.** (A) Via clàssica d'interacció amb l'element ARE en el promotor. (B) Via alternativa d'activació de la via de senyalització de les MAPK que finalment fosforila al factor de transcripció CREB, que s'uneix al promotor. Adaptat de Walker and Cheng, 2005.

Apart de la testosterona, hi ha evidències d'una possible implicació dels **estrògens** en la producció d'espermatozoides. Les cèl·lules germinals presenten l'enzim P-450 aromatasas actiu, el qual pot convertir andrògens en estrògens. També s'ha trobat la presència de receptors d'estrògens ( $ER\alpha$  i  $ER\beta$ ) en el testicle. Ambdós receptors s'expressen a les cèl·lules germinals (O'Donnell et al., 2001). Experiments en diferents fases de desenvolupament, des dels espermatogonis a espermàtides en elongació amb ratolins *knockout* pel receptor dels estrògens ( $ER\alpha$ KO o  $ER\beta$ KO) o pel gen de l'aromatasa ( $Ar$ KO), així com l'estudi d'individus amb mutacions al receptor  $ER\alpha$ , mostren un dany progressiu a l'espermatogènesi, consistent en anormalitats a les cèl·lules postmeiòtiques, conjuntament amb un augment de l'apoptosi (Fisher et al., 1998; Robertson et al., 1999).

Aquestes evidències suggereixen que els estrògens haurien d'exercir, ni que sigui mínimament, una funció en el testicle adult. A més, els espermatozoides a l'epidídim també contenen l'enzim P-450 actiu, l'expressió del qual va disminuint progressivament a mida que l'esperma avança per l'epidídim (Aquila et al., 2002). El conjunt d'aquestes dades suggereix que les espermàtides

podrien sintetitzar estrògens i que la presència dels estrògens a l'espermatozoide pot ser important en la seva maduració.

Les cèl·lules de Sertoli i les germinals mantenen una forta i estreta relació al llarg de l'espermatogènesi. A l'inici de la pubertat, les cèl·lules de Sertoli estableixen fortes unions entre elles i amb les cèl·lules germinals que comencen a diferenciar-se, quedant englobades dintre. Aquestes unions, conegudes com a Barrera Hemato-Testicular (BHT), tenen una doble funció; per un costat mantenir i protegir la integritat de l'epiteli i, per l'altre, facilitar la comunicació inter-cel·lular. Com a conseqüència de la compartimentació de l'epiteli seminífer per part de la BHT, les cèl·lules germinals en divisió, espermatòcits i espermàtides, com també els espermatozoides, es localitzen dins la BHT mentre que els espermatogonis es localitzen fora, al compartiment basal juntament amb les cèl·lules de Sertoli. Les cèl·lules de Sertoli, en estar a prop dels capil·lars sanguinis, oxiden la glucosa produint gran quantitat de lactat (Fritz et al, 1981; Mita and Hall, 1982) que és transportat a través del seu transportador específic MCT2, en elevades concentracions cap a les cèl·lules germinals postmeiòtiques (Figura 3.2).



**FIGURA 3.2. Esquema de la relació de cooperació que s'estableix entre una cèl·lula de Sertoli i una cèl·lula germinal.** La cèl·lula de Sertoli capta glucosa que serà processada per la via glucolítica cap a lactat. Aquest passa a les cèl·lules germinals gràcies a un transportador específic, MCT2. En aquestes cèl·lules el lactat és oxidat cap a piruvat (aquest procés està catalitzat per l'enzim d'expressió específica LDHA). Tanmateix, hi han diversos factors que hi poden influir positiva o negativament. (Boussouar and Benahmed, 2004)

Aquesta **cooperació metabòlica** entre les cèl·lules de Sertoli i les germinals pot afectar-se per l'exposició a tòxics, per exemple amb la Flutamida (Goddard et al., 2003), que redueix la producció i el transport del lactat cap a les cèl·lules germinals meiótiques i postmeiótiques, que acaben morint. D'aquesta manera, la presència de lactat es podria considerar com un factor de supervivència perquè inhibeix l'apoptosi de les cèl·lules germinals així com també estimula la síntesi de RNA i de proteïnes a les espermàtides (Erkkila et al., 2002; Jutte et al., 1981).

D'altra banda, les cèl·lules de Sertoli produeixen estímuls bioquímics en forma de factors de creixement (SCF, TGF $\alpha$  i  $\beta$ , BMP, IGF, FGF, EGF) i/o nutrients específics necessaris per a què les cèl·lules germinals sobrevisquin formant un microambient únic al compartiment adluminal (Griswold,

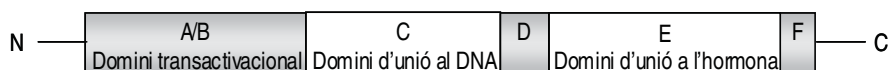
1988; Griswold, 1995; Griswold, 1998). Algunes de les glicoproteïnes que fabriquen tenen funcions com a transportadors, proteases i inhibidors, components de la matriu extracel·lular i reguladors de la divisió, la diferenciació i el metabolisme de les cèl·lules germinals. Per exemple: citoquines, factors de creixement, molècules senyalitzadores i hormones (veure la taula 1 de la introducció general d'aquesta memòria de tesi doctoral). No obstant, no són només les cèl·lules de Sertoli les que influeixen sobre les cèl·lules germinals. L'expressió d'alguns gens a les cèl·lules de Sertoli varia segons la progressió en les fases de l'espermatogènesi per part de les germinals, suggerint una bidireccionalitat en la comunicació entre ambdós tipus cel·lulars (Zabludoff et al., 2001).

Amb aquests antecedents, el següent punt d'anàlisi en aquesta tesi va ser l'estudi de les possibles implicacions de les hormones esteroidees en el control de l'enzim PFK-2 en el testicle durant l'espermatogènesi. I provar tant si la testosterona i els estrògens podien exercir un efecte de regulació directe sobre el gen *Pfkfb4*, com si la seva acció podia estar mediada per les cèl·lules de Sertoli indirectament a través d'algun factor que aquestes alliberessin al medi com a resultat de l'acció hormonal.

## RESULTATS

### Relació entre les hormones esteroïdals i el gen *Pfkfb4*.

El receptor glucocorticoide (GR) pertany a una superfamília de receptors que inclouen aquells que reconeixen andrògens, progesterona, estrògens i retinoides com a lligands (Encio and Detera-Wadleigh, 1991; Evans and Hollenberg, 1988). Tots ells comparteixen una estructura canònica formada per diferents dominis funcionals, tal com es pot observar a la Figura 3.3.



**FIGURA 3.3. Representació esquemàtica de l'estructura del receptor glucocorticoide.** S'han assenyalat els diferents dominis funcionals des de l'extrem aminoterminal (N) fins a l'extrem carboxiterminal (C). Adaptat d'Encio and Detera-Wadleigh, 1991; Evans and Hollenberg, 1988.

De tots els dominis que conformen aquesta família de receptors, el domini d'unió al DNA (DBD) i el domini d'unió a l'hormona (HBD) es troben conservats entre espècies. Així mateix, tots els receptors de la superfamília comparteixen una elevada homologia en la seqüència dels dominis DBD i

HBD i actuen com a factors de transcripció dependent del lligand. Malgrat que tots es podrien unir als mateixos elements de resposta al glucocorticoide (GRE), cadascun regula processos cel·lulars diferents.

Les hormones esteroïdals, actuant com a factors de transcripció, reconeixen una seqüència palindròmica imperfecte de quinze nucleòtids en els gens diana (ARE: 5'-GGTACA nnn TGTTCT -3' i ERE: 5'-AGGTCA nnn TGACCT -3' (Devos et al., 1997; O'Lone et al., 2004). Tot i que les seqüències palindròmiques són les predominants com a elements de resposta ARE i ERE, hi han molts gens que només presenten mig element consens ERE en el seu promotor. El mig element ERE presenta menor afinitat d'unió al complex hormona-receptor que l'element ERE sencer. Per aquesta raó, aquests gens presenten dos o tres elements ERE no complerts en la seva seqüència promotora (O'Lone et al., 2004).

Tenint en compte que a la seqüència promotora del gen *Pfkfb4* hi ha possibles elements de resposta a les hormones (andrògens i estrògens) a les posicions -506, -990, -1609, -1891, -2292, -2738 i -2884 (Figura 3.4), es va avaluar quina resposta provoquen sobre l'expressió del gen *Pfkfb4* les hormones testosterona i estradiol, ambdues amb funcions importants a l'espermatogènesi.

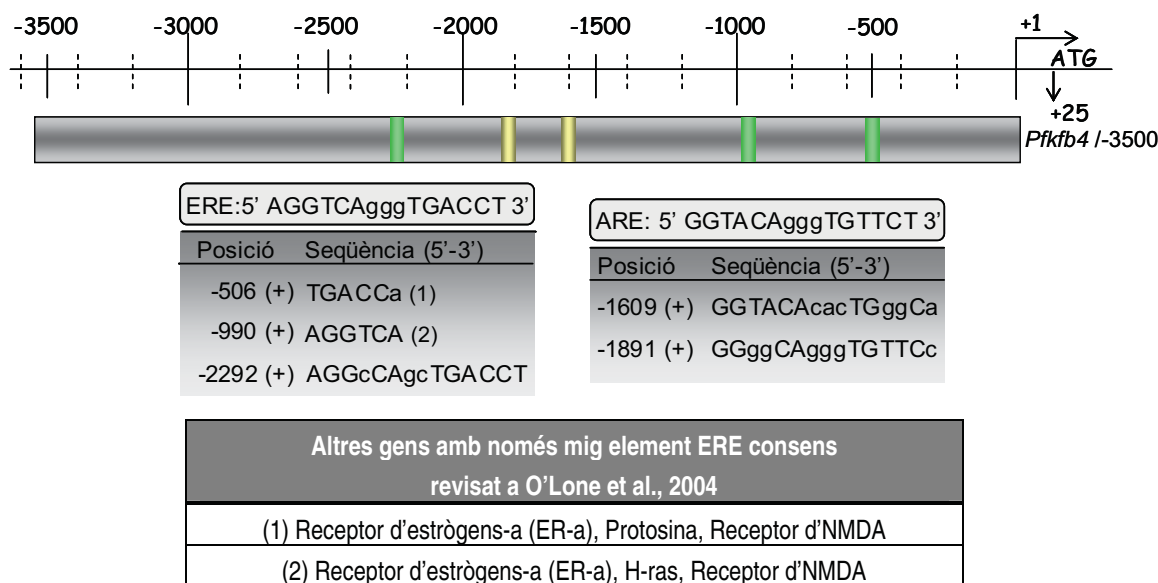
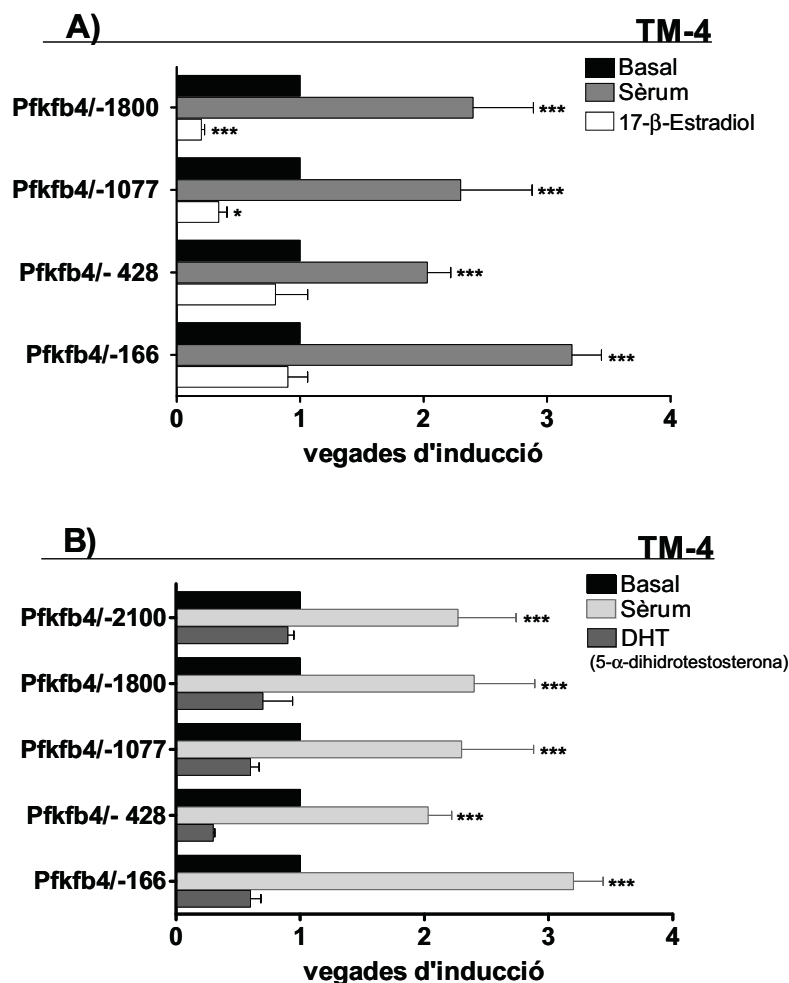


FIGURA 3.4. Esquema dels -3500 nucleòtids del promotor del gen *Pfkfb4* amb les posicions ARE (groc) i ERE (verd) marcadés. (1): consens dreta, (2): consens esquerra. Sentit de la cadena de DNA (+) i (-).

Per estudiar la resposta a les hormones esteroïdals, com la testosterona i l'estradiol, sobre el gen *Pfkfb4*, es va transfectar una línia cel·lular establerta de Sertoli de ratolí, les cèl·lules TM-4, les quals expressen els receptors d'hormones esteroidees. A continuació es va assajar l'estimulació

hormonal del promotor, tractant les cèl·lules TM-4 amb  $10^{-9}$  M de  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) o  $10^{-9}$  M de  $17\text{-}\beta$ -estradiol després de transfectar-hi transitòriament les construccions del promotor *Pfkb4*. Els efectes exercits per aquests tractaments, durant 16 hores, es mostren com a vegades d'inducció de l'activitat relativa de la luciferasa, del plasmidi assajat sota els tractaments, respecte al nivell basal d'activitat de la mateixa construcció sense tractar (a qui se li va donar el valor de 1). Per poder comparar entre les diferents construccions els resultats es van corregir per la seva corresponent activitat  $\beta$ -galactosidasa.

Per verificar que l'estudi s'estava fent correctament i que les construccions del promotor funcionaven a la línia cel·lular de Sertoli TM-4, també es va analitzar la resposta al sèrum, demostrant que totes les construccions responien positivament al sèrum entre dos i tres vegades respecte el valor basal, fins i tot la unitat mínima promotora caracteritzada dins els primers 141 nucleòtids del promotor. Així mateix, es va validar la línia TM-4 com a model en l'estudi de l'efecte de l'estimulació hormonal sobre el promotor del gen *Pfkb4*. Els resultats es representen a la Figura 3.5.



**FIGURA 3.5.** Efecte dels tractaments hormonals sobre l'activitat del promotor *Pfkb4*. Activitat luciferasa de cèl·lules TM-4 transfectades amb diferents construccions del promotor *Pfkb4* i tractades amb 7.5% sèrum (5% horse serum i 2.5% fetal calf serum),  $10^{-9}$  M  $17\text{-}\beta$ -estradiol (A) i  $10^{-9}$  M  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) (B). Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la construcció sense tractar que s'agafa com a 1. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de  $\beta$ -galactosidasa. Es representa la mitjana de tres experiments independents amb triplicats  $\pm$  S.E. Les barres que porten (\*)=( $P<0.1$ ) i (\*\*\*)=( $P<0.001$ ) són estadísticament diferents.

Com es pot observar a la Figura 3.5A, el tractament amb 17- $\beta$ -estradiol només semblava tenir efecte, i aquest era negatiu, sobre les construccions *Pfkfb4*/-1077 i *Pfkfb4*/-1800, reduint la resposta luciferasa a més de la meitat respecte el basal. Aquestes dades indicarien que en la regió del promotor entre les posicions -428 i -1077 podria haver alguna possible seqüència d'unió que mediés la resposta a l'estradiol. Es suggereixen els elements de resposta a hormones (ERE) presents a les posicions -506 i -990 com a candidats.

A la Figura 3.5B es pot observar com el tractament amb 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona no va causar cap efecte significatiu en les activitats luciferases de les construccions del promotor *Pfkfb4*. Podria ser degut a que les possibles caixes de resposta a andrògens presents al fragment de -2100 nucleòtids no són suficients per a induir una resposta a la testosterona i es faria necessari ampliar la zona d'estudi del promotor per tal d'analitzar la possible regulació d'aquest sobre el promotor. D'altra banda es podria pensar que la testosterona, *per se*, directament no afecta l'expressió del gen *Pfkfb4* ja que les cèl·lules germinals, on s'expressa la proteïna, no presenten receptors d'andrògens i els possibles efectes d'aquesta hormona serien indirectes.

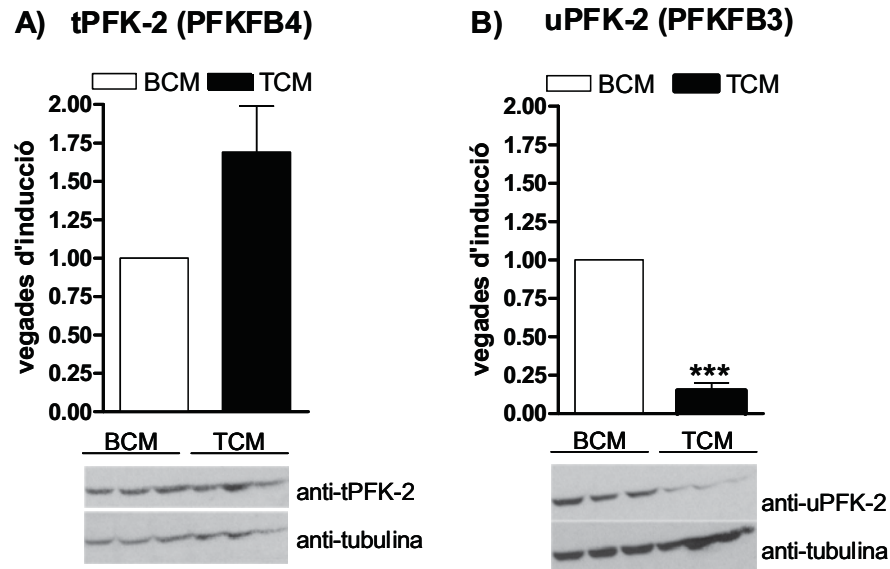
## **Role de les cèl·lules de Sertoli en la regulació de l'expressió de les proteïnes PFKFB3 i PFKFB4.**

Segons les dades del primer capítol de resultats, es podria sostenir la idea d'una possible alternança en l'expressió de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) durant l'espermatogènesi i l'espermioogènesi. Els següents experiments es van realitzar amb la finalitat de determinar si podrien ser les cèl·lules de Sertoli les responsables de regular el canvi d'isoforma produint algun tipus de factor que es secreti al medi en resposta a l'estimulació per testosterona que té lloc durant el procés espermatogènic.

Amb l'objectiu d'estudiar aquesta possible relació es van incubar les cèl·lules de Sertoli de ratolí TM4, durant 24 o 48 hores amb medi basal, medi suplementat amb sèrum al 7.5% (*fetal calf serum* i *horse serum*) i medi basal suplementat amb  $10^{-9}$  M de DHT. Passades les 24-48 hores, es va recollir el medi de cultiu, es va centrifugar per eliminar les possibles cèl·lules mortes i es va guardar a -20°C, fins a la seva utilització. Aquest medi, es va anomenar medi condicionat o **CM**, i es va utilitzar, directament, per cultivar les cèl·lules germinals. Les línies cel·lulars germinals, GC-1 i GC-2, es van cultivar amb medi suplementat amb sèrum (10% *fetal calf serum*), amb testosterona ( $10^{-9}$  M) i amb el



medi condicionat basal (BCM), o condicionat amb testosterona (TCM). Passades les 24 hores, es va recollir l'extracte proteic total i es va analitzar l'expressió de les proteïnes tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3) amb un Western blot (Figura 3.6).

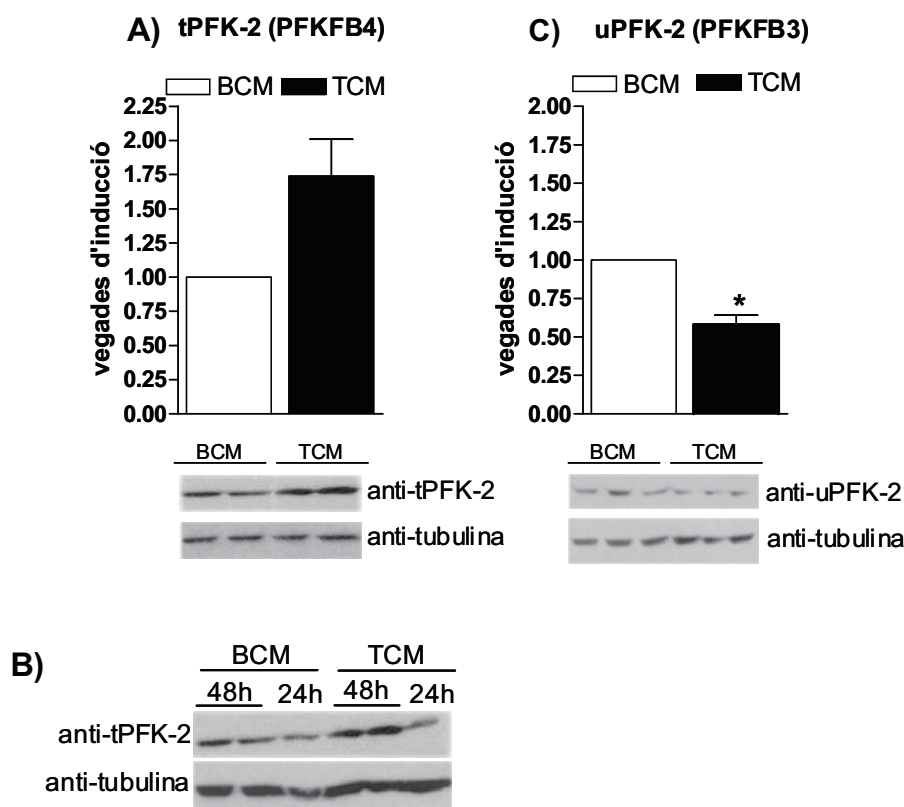


**FIGURA 3.6.** Efecte del medi condicionat provinent de cèl·lules de Sertoli sobre les proteïnes tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3). Les cèl·lules germinals GC-1 spg, es van tractar amb medi condicionat basal (BCM) i medi condicionat amb testosterona (TCM), durant 24 hores. Es van carregar 50 µg d'extracte proteic total de GC-1 per fer l'anàlisi per Western blot. (A) Anàlisi per tPFK-2 (PFKFB4) i (B) anàlisi per uPFK-2 (PFKFB3). A sobre de les membranes de Western, es mostra la densitometria corresponent. (\*\*\*)=( $P < 0.001$ ).

Quan es va analitzar l'expressió de la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) a la línia cel·lular GC-1 spg, es va observar que el cultiu d'aquestes amb el medi condicionat amb testosterona (TCM) provinent de les cèl·lules de Sertoli, feia incrementar lleugerament l'expressió de tPFK-2 (PFKFB4) respecte el tractament amb el medi condicionat basal (BCM) (Figura 3.6A). Pel que fa a la proteïna uPFK-2 (PFKFB3), sota el tractament amb el medi condicionat amb testosterona (TCM) es va reduir la seva expressió fins a ser quasi imperceptible, amb un valor del voltant del 25% respecte l'expressió que tenia amb el tractament amb el medi condicionat basal (Figura 3.6B).

Quan es va repetir l'experiment a la línia cel·lular GC-2 spd (ts), l'expressió de la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) es va incrementar lleugerament en cultivar aquestes cèl·lules amb el medi condicionat amb testosterona (TCM) provinent de cèl·lules de Sertoli respecte el tractament amb el medi condicionat basal (BCM), tal com es mostra a la Figura 3.7A. A més, aquesta resposta depèn del temps que hagi tardat en recollir-se el medi condicionat des de l'aplicació del tractament de 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona a les cèl·lules de Sertoli. Així, l'increment d'expressió de tPFK-2 (PFKFB4) va ser major quan el medi condicionat havia estat 48 hores en contacte amb les cèl·lules de Sertoli (Figura

3.7B) en comparació amb un que va estar només 24 hores. L'expressió de la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) es va reduir en tractar les cèl·lules germinals GC-2 spd (ts) amb el medi condicionat amb testosterona (TCM) respecte l'expressió que tenia amb el tractament amb el medi condicionat basal (BCM) (Figura 3.7C).

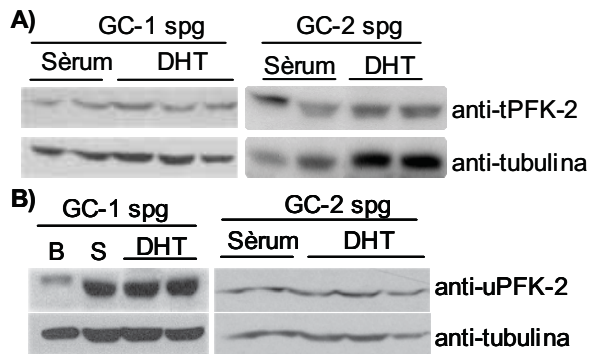


**FIGURA 3.7. Efecte del medi condicionat de Sertoli sobre les proteïnes tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3).** Les cèl·lules germinals GC-2 spd (ts), es van tractar amb medi condicionat basal (BCM) i medi condicionat amb testosterona (TCM), durant 24 hores. Es van carregar 50 µg d'extracte proteic total de GC-2 per fer l'anàlisi per Western blot. (A) Anàlisi per tPFK-2 (PFKFB4) i (C) anàlisi per uPFK-2 (PFKFB3). A sobre de les membranes de Western, es mostra la densitometria corresponent. (B) Anàlisi de l'expressió de tPFK-2 (PFKFB4) en funció del temps que s'ha trigat en condicionar el medi CM; 24 o 48 hores en contacte amb les cèl·lules de Sertoli.

Aquests resultats assenyalarien que en el medi condicionat TCM podria existir algun factor soluble produït per les cèl·lules de Sertoli i secretat al medi de cultiu en resposta a l'estimulació hormonal per part de la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona que podria regular, bé directa o indirectament, l'expressió de les proteïnes tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3) en les cèl·lules germinals durant l'espermatogènesi. El fet que en el medi condicionat de 48 hores l'augment d'expressió sigui major que en el de 24 hores reforçaria la idea de l'augment de concentració d'algun factor de creixement en aquest medi que afectés a l'expressió de tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3).

Per tal de descartar que els efectes del medi condicionat TCM sobre les proteïnes tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3) no fossin deguts a la presència de restes de 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona

(DHT) en el medi de cultiu, es van cultivar directament les cèl·lules germinals amb  $10^{-9}$  M d'aquesta hormona durant 24 hores, i es van analitzar les seves expressions per mitjà d'un Western blot. Com es pot observar a la Figura 3.8 A, la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) no es veu afectada pel tractament directe amb DHT, mentre que uPFK-2 (PFKFB3) (Figura 3.8 B) s'incrementa d'igual manera amb els tractaments amb sèrum i amb DHT respecte la situació basal.



**FIGURA 3.8. Efecte de l'hormona testosterona sobre les proteïnes tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3).** Les cèl·lules germinals GC-1 spg i GC-2 spd (ts), es van tractar amb medi suplementat amb DHT ( $10^{-9}$  M) durant 24 hores. Es van carregar 50  $\mu$ g d'extracte proteic total per fer l'anàlisi per Western blot.

Aquests resultats indicarien que la presència de  $10^{-9}$  M de  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) en el medi de cultiu de les cèl·lules germinals no era la causa dels efectes sobre l'expressió dels isoenzims de la PFK-2 ubic i testicular que s'havien observat en cultivar aquestes cèl·lules amb el medi condicionat obtingut 24 o 48 hores després del tractament de les cèl·lules de Sertoli amb DHT ( $10^{-9}$ M).

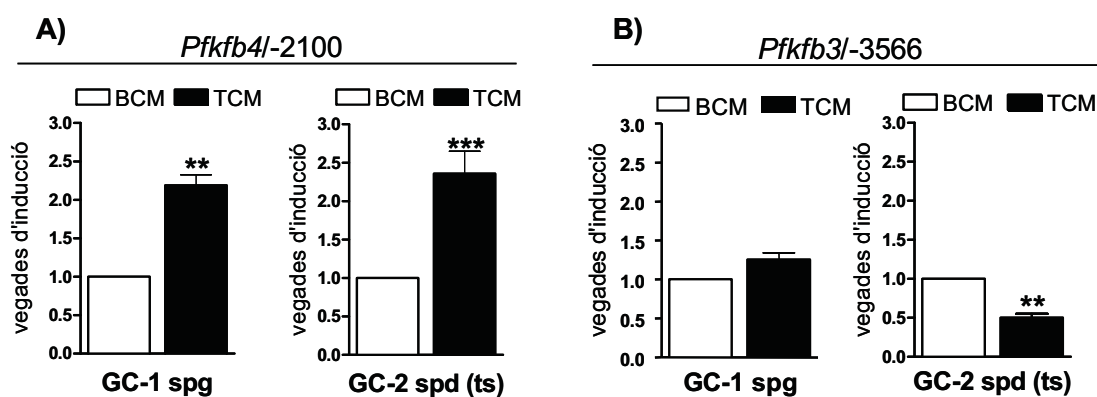
D'altra banda, els efectes del medi condicionat amb testosterona (TCM) sobre tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3) podrien ser deguts a algun factor que les cèl·lules de Sertoli produeixen gràcies a l'estimulació hormonal d'aquestes amb DHT i que el van secretant al medi de cultiu condicionat on es va acumulant. Així doncs, aquest factor soluble podria ser el mediador de l'acció de la testosterona, via Sertoli, sobre les cèl·lules germinals.

Seguidament es va estudiar si els efectes observats sobre els isoenzims uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) del medi condicionat amb testosterona (TCM), podrien ser explicats per un augment en la transcripció dels gens que codifiquen per aquestes proteïnes, *Pfkfb3* i *Pfkfb4* respectivament.

Donat que es disposava de diverses construccions dels promotors dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* per fer anàlisi de luciferasa, es van transfectar transitòriament les línies cel·lulars germinals GC-1 spg i GC-2 spd(ts) amb les construccions de major longitud d'ambdós promotors; *Pfkfb3*-3566 i *Pfkfb4*-2100. Després de la transfecció dels plasmidis les cèl·lules es van sotmetre, durant 24 hores, als tractaments amb medi condicionat basal (BCM) i medi condicionat amb testosterona (TCM) que es va recollir després de 48 hores de tractar les cèl·lules de Sertoli amb  $5\alpha$ -dihidrotestosterona. A la Figura 3.9 es mostren les activitats luciferasa obtingudes per cada transfecció. El resultat s'expressa com a vegades d'inducció de l'activitat luciferasa del plasmidi estudiat, sota el tractament amb TCM, respecte

al nivell basal d'activitat de la mateixa construcció amb BCM, a qui se li assignava el valor de 1. Per poder comparar entre les diferents construccions del promotor, es van corregir els resultats per l'eficiència de transfecció de cada construcció amb els corresponents valors de  $\beta$ -galactosidasa (Figura 3.9).

La construcció *Pfkfb4*-2100, tant a les cèl·lules GC-1spg com a les GC-2 spd (ts), presenta un augment en l'activitat luciferasa sota el tractament amb el medi condicionat TCM d'unes dues vegades d'inducció, respecte al medi BCM (Figura 3.9A). Pel que fa a la construcció *Pfkfb3*/3566, a les cèl·lules GC-1 no hi ha diferències entre la resposta a BCM i a TCM. Per a, a les cèl·lules GC-2 el tractament amb el medi TCM disminueix la resposta luciferasa a quasi la meitat respecte la condició basal (Figura 3.9B).



**FIGURA 3.9. Efecte dels medis condicionats de Sertoli sobre l'expressió dels gens *Pfkfb4* i *Pfkfb3*.** Les construccions *Pfkfb4*-2100 (A) i *Pfkfb3*-3566 (B) es va transfectar transitòriament a les cèl·lules germinals, GC-1 spg i GC-2 spd(ts). Aquestes cèl·lules van ser tractades, durant 24 hores, amb els medis condicionats de 48 hores basal (BCM) i de testosterona (TCM). Passat el temps del tractament, es va mesurar l'activitat luciferasa. Les transfeccions es van realitzar com a mínim per triplicat, i es van fer les mitjanes dels valors individuals per a donar el resultat d'un experiment. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la construcció sense tractar que s'agafa com a 1. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de  $\beta$ -galactosidasa (60 ng). Es representa la mitjana de cinc experiments independents ( S.E. (\*\*)=( $P < 0.01$ ), (\*\*\*)=( $P < 0.001$ )).

Aquests resultats reforçarien la idea ja plantejada de que en el medi condicionat TCM existiria algun factor produït per les cèl·lules de Sertoli i secretat al medi de cultiu en resposta a la estimulació amb testosterona que en posar-lo en contacte amb les cèl·lules germinals podria regular, bé directa o indirectament, la transcripció dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* en aquestes cèl·lules germinals durant l'espermatogènesi.

## Localització d'algun possible element de resposta al medi condicionat en el promotor *Pfkfb4*.

Tot i estar clar segons els anteriors resultats que en el medi condicionat podria existir un factor soluble que podria regular (ja sigui per interacció directa o indirectament a través d'algun altre factor diana activat) positivament la transcripció del gen *Pfkfb4*, i negativament la transcripció del gen *Pfkfb3*, trobar quins possibles factors serien candidats per a aquesta regulació pot ser un treball molt més complicat. Segons la bibliografia hi ha alguns factors que són secretats per les cèl·lules de Sertoli (TGF  $\alpha$  i  $\beta$ , BMP, EGF, IGF, FGF) que podrien ser els mediadors d'aquesta resposta. No obstant, com ja s'ha esmentat a la introducció, el mediador entre les cèl·lules germinals i les cèl·lules de Sertoli que determinaria el mecanisme implicat en la resposta a la testosterona és encara desconegut.

Amb la idea d'acotar quina seqüència de la regió promotora podria estar implicada en la resposta al medi condicionat amb testosterona (TCM) es va transfectar transitòriament la línia cel·lular d'espermatogoni de ratolí GC-1 spg amb les diferents construccions del promotor *Pfkfb4*: *Pfkfb4*-166; *Pfkfb4*-428, *Pfkfb4*-1077, *Pfkfb4*-1800 i *Pfkfb4*-2100. Després de la transfecció dels plasmidis, les cèl·lules es van dejunar amb medi basal sense sèrum durant 24 hores. Passat aquest temps, es van tractar les transfeccions amb tres tipus de medis condicionats:

1. Medi BCM: l'obtingut de cèl·lules de Sertoli 48 hores després de tenir-les en medi DMEM sense sèrum. Els resultats es presenten a la Figura 3.10A.
2. Medi SCM: l'obtingut de cèl·lules de Sertoli 48 hores després de tenir-les en medi DMEM amb 10% sèrum. Els resultats es mostren a la Figura 3.10B.
3. Medi TCM: l'obtingut de cèl·lules de Sertoli 48 hores després de tenir-les en medi DMEM (sense sèrum) tractat amb  $10^{-9}$  M de  $5\alpha$ -dihidrotestosterona. Aquest tractament també es va assajar sobre les cèl·lules GC-2 spd(ts) transfectades transitòriament amb les construccions del promotor *Pfkfb4*. Els resultats es presenten a la Figura 3.11A.

Tots els resultats s'expressen com a vegades d'inducció d'activitat luciferasa del plasmidi estudiat, sota els tractaments corresponent (SCM o TCM) respecte al nivell d'activitat luciferasa de la mateixa construcció sota el tractament BCM, a qui se li assignava el valor de 1 (Figures 3.10B i 3.11, respectivament). En el cas del tractament BCM, aquest es representa versus el nivell basal obtingut per cada construcció sense tractar (Figura 3.10A). Per poder comparar entre les diferents construccions del promotor, es va corregir els resultats per l'eficiència de transfecció de cada construcció amb els corresponents valors de  $\beta$ -galactosidasa.

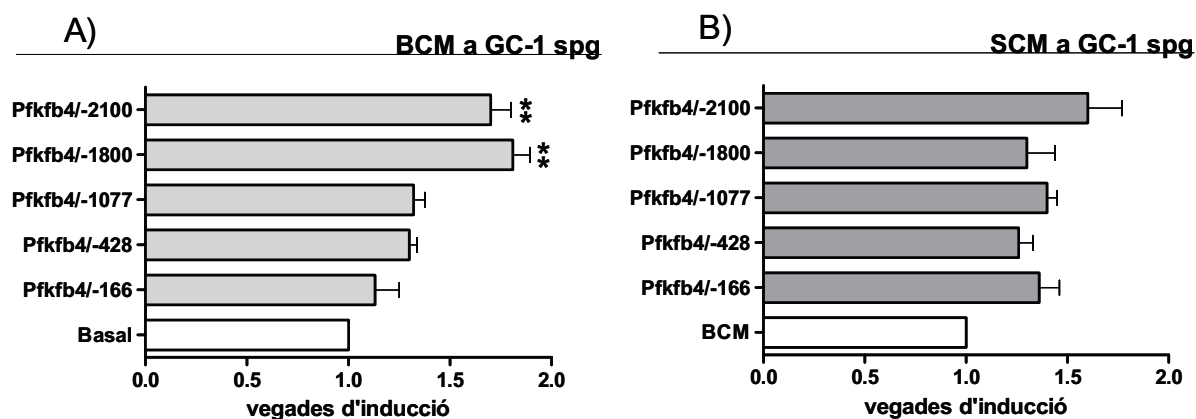


FIGURA 3.10. Resposta de les construccions promotores del gen *Pfkfb4* als medis condicionats de Sertoli. Les diferents construccions es van transfectar de forma transitòria a les cèl·lules germinals GC-1 spg. Les cèl·lules van ser tractades amb medi basal, (A) medi condicionat basal (BCM) i (B) medi condicionat amb sèrum (SCM), durant 24 hores, després es va mesurar l'activitat luciferasa. Les transfeccions es van realitzar com a mínim per triplicat, i es van fer les mitjanes dels valors individuals per a donar el resultat d'un experiment. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la construcció sense tractar que s'agafa com a 1. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de -galactosidasa. Es representa la mitjana de tres experiments independents (S.E. (\*\*)= $P < 0.01$ ).

Com es pot observar a la Figura 3.10A, el tractament amb el medi condicionat basal (BCM) de les cèl·lules GC-1spg va augmentar l'activitat luciferasa fins a dues vegades d'inducció respecte la condició basal a les construccions *Pfkfb4*/-1800 i *Pfkfb4*/-2100. No hi va haver cap resposta en les construccions de menor grandària (*Pfkfb4*/-166; *Pfkfb4*/-428, *Pfkfb4*/-1077). Els resultats de la Figura 3.10B mostren que el tractament de les cèl·lules amb el medi condicionat amb sèrum (SCM) no va produir cap resposta entre les diferents construccions promotores assajades en comparació amb la resposta que es va obtenir amb el medi BCM, tal com es pot observar a la Figura 3.10B.

Els resultats del tractament amb medi condicionat amb testosterona (TCM) sobre les diferents construccions del promotor *Pfkfb4* en les cèl·lules GC-1spg i en les cèl·lules GC-2spd (ts) es mostren a les Figures 3.11A i 3.11B, respectivament.

En relació amb el tractament amb el medi condicionat amb testosterona (TCM), les respostes d'activitat luciferasa en les cèl·lules GC-1 spg per les construccions *Pfkfb4*/-166, *Pfkfb4*/-428, *Pfkfb4*/-1077 no es diferenciaven dels valors obtinguts en tractar amb BCM. Però, les construccions de major longitud, *Pfkfb4*/-1800 i *Pfkfb4*/-2100, presentaven valors de luciferasa al voltant de 2 vegades d'inducció respecte el control (BCM), respectivament. Per tant, el medi TCM podria regular transcripcionalment, en positiu, l'expressió del gen *Pfkfb4* als espermatogonis, la regió clau d'aquesta resposta estaria localitzada entre els aproximadament 800 nucleòtids de diferència entre les construccions *Pfkfb4*/-1077 i *Pfkfb4*/-1800.

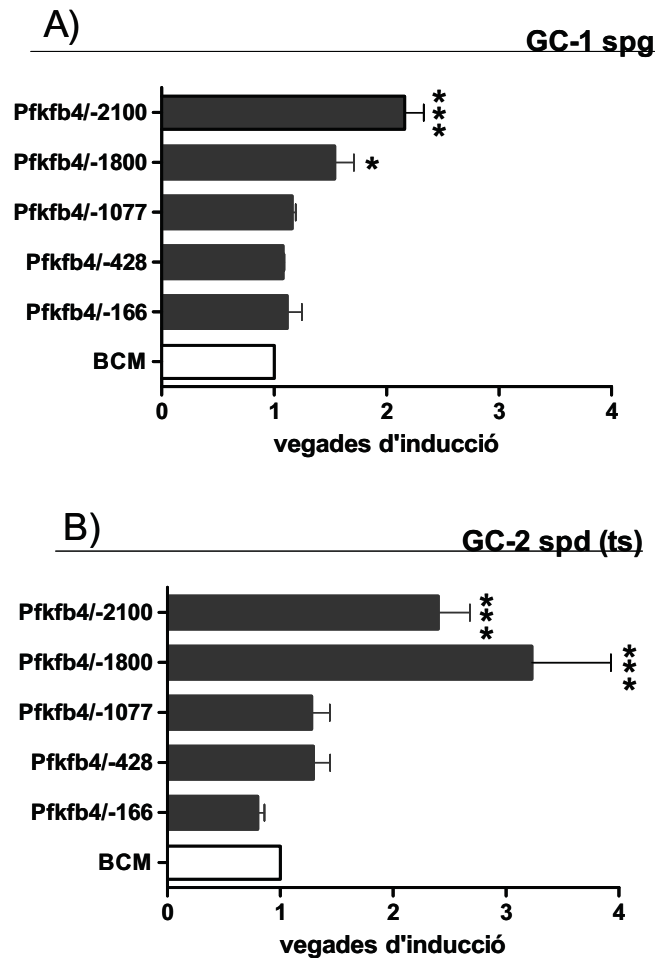


FIGURA 3.11. Activitat luciferasa de les diferents construccions de la regió 5'- del gen *Pfkfb4* com a resposta al medi condicionat de Sertoli amb Testosterona (TCM). Les diferents construccions es van transfectar de forma transitòria a les cèl·lules germinals GC-1 spg (A) i a les GC-2 spd (ts) (B). Les cèl·lules van ser tractades amb medi condicionat basal (BCM) i medi condicionat amb testosterona (TCM), durant 24 hores. Passat aquest temps es va mesurar l'activitat luciferasa. Les transfeccions es van realitzar com a mínim per triplicat i es van fer les mitjanes dels valors individuals per a donar el resultat d'un experiment. Els resultats s'expressen com a vegades d'inducció respecte el valor de la construcció tractada amb BCM que s'agafa com a 1. L'activitat luciferasa està normalitzada amb els valors de  $\beta$ -galactosidasa (60 ng). Es representa la mitjana de tres experiments independents (S.E. Les barres que porten \*)=( $P<0.05$ ) i (\*\*)=( $P<0.001$ ) són estadísticament diferents.

En estudiar la resposta de les construccions del promotor *Pfkfb4* transfectades a les cèl·lules GC-2 spd (ts) i, posteriorment tractades amb el medi condicionat amb testosterona (TCM) (Figura 3-11B), es va apreciar un comportament semblant a l'obtingut amb als espermatogonis. Les construccions de menys de 1000 nucleòtids (*Pfkfb4*/-166, *Pfkfb4*/-428, *Pfkfb4*/-1077) tenien respostes de luciferasa iguals a la condició control (BCM), mentre que les construccions de més de 1000 nucleòtids (*Pfkfb4*/-1800 i *Pfkfb4*/-2100) incrementaven l'activitat de l'ordre de 3 vegades. De nou es posaria de manifest que entre els aproximadament 800 nucleòtids de diferència entre les construccions *Pfkfb4*/-1077 i *Pfkfb4*/-1800 podria localitzar-se la seqüència consens per algun factor

de transcripció responsable de la regulació transcripcional positiva en resposta al tractament amb TCM.

En conclusió, sembla clar que els medis condicionats contenen factors solubles que serien fabricats i secretats al medi per les cèl·lules de Sertoli en resposta a l'estimulació hormonal per la testosterona. Els quals afectarien tant als nivells d'expressió de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) com als nivells d'expressió dels gens que les codifiquen, *Pfkfb3* i *Pfkfb4*, respectivament. En els medis condicionats BCM i SCM es podria pensar que la presència de lactat en ells fos responsable de les respostes positives de la luciferasa en les construccions del promotor *Pfkfb4*, ja que s'ha postulat que la presència de lactat en el medi exerceix com a factor de supervivència sobre les cèl·lules germinals (Erkkila et al., 2002; Jutte et al., 1981; Nakamura et al., 1981). Altrament, per a la resposta obtinguda amb el medi condicionat TCM caldria pensar en la presència d'un factor soluble resultant de l'estimulació per la testosterona de les cèl·lules de Sertoli, que podria interaccionar directament amb la seqüència promotora o bé podria activar algunes vies de senyalització quan entra en contacte amb les cèl·lules germinals: espermatogonis i espermatòcits, que incrementaria la resposta luciferasa del gen *Pfkfb4*. La regió promotora de 800 nucleòtids entre les posicions -1077 i -1800 seria la que presentaria algun element de resposta responsable de la regulació transcripcional positiva.

Tenint en compte que els factors paracrins produïts per les cèl·lules de Sertoli majoritàriament pertanyen a la família del TGF- $\beta$  (com pot ser el mateix TGF o BMP), es va estudiar en detall la seqüència d'aquests 800 nucleòtids mitjançant programes informàtics (Transfac, ECR Browser) per tal de trobar-hi elements de resposta a algun dels seus efectors transcripcionals. En aquesta regió del promotor del gen *Pfkfb4* s'han trobat possibles seqüències d'unió a proteïnes Smads (5'-CTGT-3' i la seva complementària 5'-AGAC-3') que es troben conservades tant a ratolí com a gos (Massagué et al., 2006). En la regió de 300 nucleòtids compresa entre les construccions promotores del gen *Pfkfb4*: *Pfkfb4*-1800 i *Pfkfb4*-2100 també es varen identificar dues possibles caixes de resposta a Smads, però aquestes es distribuïen en tàndem (posicions: -1782 i -1977, 5'-GTCTAGAC-3) (Massagué et al., 2006). En última instància, aquests putatius elements podrien ser els responsables de regular la transcripció del gen *Pfkfb4* en resposta a l'estimulació produïda pel medi condicionat amb testosterona (TCM) sobre les cèl·lules germinals.



## DISCUSSIÓ I PERSPECTIVES FUTURES

La regulació hormonal a l'espermatogènesi és produïda per l'acció de les hormones FSH i Testosterona sobre les cèl·lules de Sertoli i no sobre les germinals, ja que als túbuls seminífers només les cèl·lules de Sertoli presenten els receptors per aquestes hormones (Walker and Cheng, 2005). L'acció combinada d'ambdues hormones sobre les cèl·lules de Sertoli estimula la secreció de pèptids (veure Taula 1 de la introducció general de la memòria de tesi) que garanteixen la supervivència i afavoreixen la divisió i la diferenciació de les cèl·lules germinals. L'acció hormonal també afavoreix la creació d'unions especialitzades entre les cèl·lules de Sertoli i les germinals per a formar un ambient aïllat i afavorir la diferenciació a espermatozoides durant la migració cap al lumen tubular.

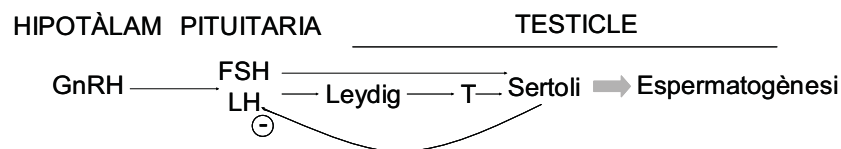


FIGURA 3.12. Esquema del control hormonal durant l'espermatogènesi. GnRH: Hormona alliberadora de Gonadotropines, FSH: Hormona estimulant del Fol·licle, LH: Hormona Luteinizant, T: Testosterona.

La **testosterona** (T) és necessària a les cèl·lules de Sertoli per a tres funcions principals: pel manteniment de la Barrera Hemato-Testicular, per la supervivència de les cèl·lules germinals durant la meiosi i per la sortida dels espermatozoides madurs cap al lumen (Denolet et al., 2006; Holdcraft and Braun, 2004; Meng et al., 2005). En assajar els possibles efectes de la testosterona sobre l'activitat transcripcional del gen *Pfkfb4* no s'han trobat resultats positius almenys en els primers -2000 nucleòtids de la regió promotora. Així mateix, tampoc es va trobar resposta positiva en estudiar els efectes de la testosterona sobre l'expressió de la proteïna tPFK-2 (PFKFB4).

La presència d'**estrògens** en el testicle resulta necessària per la supervivència de les cèl·lules germinals. Les cèl·lules somàtiques dels túbuls produeixen estrògens, així com també les cèl·lules germinals ja que presenten l'enzim aromatasa P-450 actiu que transforma els andrògens en estrògens (Hess et al., 2001). D'altra banda, s'ha descrit la presència dels receptors d'estrògens (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ) expressats a les cèl·lules germinals en diferents fases de desenvolupament, des dels espermatogonis a les espermàtides (O'Donnell et al., 2001); fins i tot s'ha descrit la seva presència a la línia cel·lular GC-1spg (Vicini et al., 2006). Els animals knockout pel receptor dels estrògens (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ) mostren un dany progressiu a l'espermatogènesi, consistent en anomalies a les cèl·lules postmeiòtiques, conjuntament amb un augment de l'apoptosi (Fisher et al., 1998; Robertson et al., 1999). Aquests

danys porten, finalment, a una reducció de la fertilitat de l'animal associada a l'edat. En estudiar els efectes de l'estrogen 17 $\beta$ -estradiol sobre el gen *Pfkfb4* per transfeccions transitòries de les construccions del promotor *Pfkfb4* a la línia cel·lular de Sertoli TM-4, es va observar que la incubació de les cèl·lules amb **17- $\beta$ -estradiol** ( $10^{-9}$  M) provocava una disminució del 75% respecte l'activitat luciferasa basal de les construccions del promotor *Pfkfb4* de -1077 i -1800 nucleòtids. Caldria pensar, doncs, que alguna seqüència localitzada en aquesta regió pogués ser important en la mediació de la resposta a l'estradiol. Dels possibles elements de resposta als estrogens (ERE) que s'han localitzat al promotor del gen *Pfkfb4*, aquells que es localitzen a les posicions -506 i -990 semblaria ser els responsables de la inhibició transcripcional del gen *Pfkfb4* fruit de la presència dels estrògens en el medi de cultiu, tot i que aquestes seqüències ERE només es corresponen amb la meitat de la seqüència palindròmica consens (5'-AGGTCAGggTGACCT-3'). Diversos gens humans també presenten en les seves seqüències promotores mig element ERE, alguns d'ells són c-H ras1, ER $\alpha$ , protomiosina  $\alpha$ , el receptor per NMDA, osteoporina, etc (revisats en (O'Lone et al., 2004)). La disminució en la transcripció del gen *Pfkfb4* en presència de l'estradiol podria explicar per què la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) es comenci a detectar en major grau a partir de les espermatides en elongació (Figura 1.22 del primer capítol de resultats), i que no es detecti al llinatge somàtic, ja que a les cèl·lules testiculars els receptors d'estradiol s'expressen de manera inversa (a les cèl·lules somàtiques i des dels espermatogonis fins a les espermatides (O'Donnell et al., 2001)).

L'espermatogènesi és un procés de diferenciació altament especialitzat on els canvis de patrons en l'expressió gènica i els canvis en l'expressió proteïca han de ser controlats molt finament. Com s'ha citat abans, les cèl·lules de Sertoli responen a l'estimulació hormonal per part de la testosterona produint una sèrie de factors de creixement (SCF, TGF $\alpha$  i  $\beta$ , BMP, IGF, FGF, EGF) o proteïnes específiques necessàries per garantir la supervivència de les cèl·lules germinals. Per testar si algun d'aquests productes podria afectar l'expressió dels enzims uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4), es van tractar les cèl·lules de Sertoli TM-4 amb DHT, a les 48 hores es va recollir el medi i es va utilitzar aquest medi que l'hem anomenat **medi condicionat de Sertoli (CM)** per cultivar en ell les cèl·lules germinals GC-1 spg i GC-2 spd (ts). Sota l'estimulació d'aquest medi condicionat de Sertoli (CM), l'expressió de l'enzim uPFK-2 (PFKFB3) tant en el model d'espermatogoni (GC-1spg) com en el model d'espermatòcit (GC-2 spd (ts)) va reduir-se, entre un 75 i un 50%, respectivament, en presència del medi condicionat amb testosterona (TCM) respecte l'expressió a les mateixes cèl·lules tractades amb el medi condicionat basal (BCM). En canvi, pel que fa a l'expressió de l'enzim tPFK-2 (PFKFB4), va incrementar-se per efecte del mateix tractament al voltant de dos cops d'inducció en els dos models germinals.

Amb transfeccions de les construccions grans dels promotors *Pfkfb3* i *Pfkfb4* (*Pfkfb3*- 3566 i *Pfkfb4*- 2100, respectivament) a les cèl·lules germinals i sota els tractaments amb els medis condicionats (BCM i TCM), es va trobar que la transcripció del gen *Pfkfb3* a les cèl·lules GC-1 spg quasi no s'afectava pel tractament amb TCM, mentre que a les cèl·lules GC-2 spd (ts) es reduïa a la meitat. En canvi, la transcripció del gen *Pfkfb4* s'incrementava, més del doble, amb els tractament amb TCM en els dos models cel·lulars.

Aquests resultats implicarien l'existència en els medis condicionats d'un factor soluble produït per les cèl·lules de Sertoli i secretat al medi que afectaria a l'expressió de uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) dins de les cèl·lules germinals. Sobre uPFK-2 actuaria reduint els nivells de proteïna als espermatogonis mentre que als espermatòcits regularia tant els nivells de l'mRNA com els nivells proteics. Sobre tPFK-2 actuaria a nivell transcripcional i proteic en ambdós tipus cel·lulars.

Els efectes trobats pels medis condicionats amb testosterona obtinguts de cèl·lules de Sertoli (TCM) estaven centrats a la regió promotora entre -1077 i -1800 nucleòtids. Després de tornar a analitzar amb detall la seqüència amb bases de dades per factors de transcripció (Transfac), així com amb bases de dades que comparen les regions promotores conservades entre diferents organismes (ECR Browser) pels quals es disposi dels corresponents genomes seqüenciats, es va trobar que en la regió d'aproximadament 800 nucleòtids de diferència entre les construccions *Pfkfb4*-1077 i *Pfkfb4*-1800 hi ha diverses caixes de resposta a les proteïnes Smads (5'-GTCT-3') que podrien ser responsables en última instància de regular la transcripció del gen *Pfkfb4* en resposta al tractament amb el medi condicionat de testosterona (TCM). Per sobre dels -1800 nucleòtids també hi ha caixes de resposta a Smads, però aquestes es presenten en tàndem (5'-GTCTAGAC-3', 5'-GTCTCAGA-3'). L'afinitat de la proteïna Smad per unir-se a una caixa aïllada és relativament baixa, per aquest motiu les seves caixes de resposta es disposen formant concatàmers, resultant avantatjós per la posterior unió del factor transcripcional (Massagué et al., 2006).

Queda encara molt treball per fer en l'estudi de la implicació de les cèl·lules de Sertoli en la regulació de l'expressió a nivell transcripcional i proteic de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en les cèl·lules germinals durant l'espermatogènesi.

Primer caldria estudiar amb més deteniment quin seria l'efecte sobre l'expressió gènica i proteica de tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3) després de cultivar les cèl·lules germinals amb diferents concentracions de lactat exogen, ja que el tractament amb el medi condicionat basal (BCM) semblaria activar la transcripció de les construccions *Pfkfb4*-1800 i *Pfkfb4*-2100 del promotor *Pfkfb4*.

Igualment, s'hauria de determinar la via de senyalització per la qual actuaria el medi condicionat amb testosterona (TCM) per regular la transcripció dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4*. Una part dels

factors que secreten les cèl·lules de Sertoli: EGF, IGF, FGF poden actuar a través de la via de PI3K/AKT/mTOR (Mabjeesh et al., 2003). Hi ha evidències experimentals que descriuen com l'estimulació hormonal amb 5 -dihidrotestosterona sobre les cèl·lules LNCaP (és una línia cel·lular humana derivada de tumor de pròstata sensible als andrògens) provoca un alliberament al medi de cultiu del factor de creixement EGF. Aquest factor, present en el medi condicionat de testosterona provinent de les cèl·lules LNCaP de forma paracrina pot modular l'expressió de la proteïna HIF1 en les cèl·lules PC-3 (és una línia cel·lular humana derivada de tumor de pròstata no-sensible als andrògens) (Mabjeesh et al., 2003). El següent pas per demostrar la implicació d'aquests factors de creixement en la regulació de l'expressió gènica i proteica d'uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) seria realitzar experiments en els quals es suplementi el medi de cultiu basal amb cadascun d'ells per separat per tal de mimetitzar l'efecte del medi condicionat amb testosterona (TCM) i analitzar l'expressió tant de l'mRNA com de la proteïna de uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4). Així, d'obtenir resultats positius, s'hauria d'avaluar la implicació de la proteïna HIF1 $\alpha$  com efectora de la regulació transcripcional sobre *Pfkfb3* i *Pfkfb4*.

Aquells factors que pertanyen a la família del TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ , BMP) a través de la proteïna Smad poden regular transcripcionalment els gens diana (Massagué et al., 2006). És interessant el fet que en la regió de 800 nucleòtids del promotor del gen *Pfkfb4* que respón positivament al tractament amb el medi condicionat amb testosterona (TCM) s'hagin localitzat diversos possibles elements de resposta a Smad. Per tal de determinar el putatiu factor soluble present en el medi condicionat amb testosterona, s'hauria de tractar les cèl·lules germinals amb els diferents factors de creixement per mimetitzar l'efecte del tractament amb TCM sobre tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3). Així mateix, s'haurien de realitzar experiments on es cultivin les cèl·lules germinals amb el medi TCM, amb el medi basal suplementat amb diferents membres de la via de senyalització del TGF- $\beta$  i amb diferents inhibidors de les vies de transducció de senyals.

El nostre laboratori ja va descriure com durant la diferenciació miogènica, la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) era degradada pel proteosoma. Essent l'espermatogènesi un procés tant de proliferació com de diferenciació, s'hauria d'estudiar si la reducció en l'expressió de la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) deguda al tractament amb el medi condicionat de testosterona TCM seria degut a una degradació via proteosoma. Amb aquesta finalitat s'haurien de realitzar experiments on es cultivessin les cèl·lules germinals amb el medi TCM suplementat amb inhibidors del proteosoma.

Actualment al laboratori s'estan realitzant alguns dels experiments proposats per continuar amb l'estudi de la regulació diferencial sobre l'expressió de uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) durant l'espermatogènesi, com per exemple el cultiu directe de les cèl·lules germinals amb factors de creixement (EGF) o l'utilització d'inhibidors de les vies de transducció de senyals per tal d'analitzar

quina (PI3K/AkT, MAPK o la via del TGF- $\beta$ ) seria l'efectora de les accions del medi condicionat amb testosterona sobre l'expressió de *Pfkfb3* i *Pfkfb4* en les cèl·lules germinals.



---

## **4. -DISCUSSIÓ**

---

*Ciència es aquella sobre la qual cabe una discussió  
(José Ortega y Gasset).*





#### 4.1.- Metabolisme a les cèl·lules germinals i PFK-2/FBPasa-2.

L'espermatogènesi és un procés molt dinàmic de proliferació i diferenciació. En general, les cèl·lules en proliferació acostumen a captar nutrients en excés per afrontar les necessitats biosintètiques que comporta la duplicació de la biomassa a cada divisió (lípid, proteïnes i àcids nucleics) (DeBerardinis et al., 2008). En el testicle, són els espermatogonis i els espermatòcits aquelles cèl·lules que proliferen activament, mentre que les espermatides són les que es diferencien morfològicament.

El **metabolisme en les cèl·lules proliferants** es caracteritza per les elevades taxes glucolítiques, l'alta producció de lactat, i la biogènesi de lípid i altres macromolècules (Jutte et al., 1981; Nakamura et al., 1984a). L'alta taxa glucolítica, d'una banda permet a les cèl·lules aprofitar tota la glucosa captada per a produir abundant ATP i lactat. Tot i que el nombre de molècules d'ATP produïdes en la glucòlisi és baix, en estar molt activada la via s'aconseguiria sobrepassar les produïdes per la fosforilació oxidativa. Tanmateix, la metabolització de la glucosa per la glucòlisi i el posterior cicle de Krebs, proporciona a la cèl·lula en divisió els intermediaris que necessiten les rutes biosintètiques; glicerol i citrat per la lipogènesi i aminoàcids no essencials necessaris per la síntesi proteica i NADPH (a través de la ruta de les pentoses fosfat) (DeBerardinis et al., 2008).

En el transcurs de l'evolució, la glucòlisi és una via que s'ha conservat evolutivament. No obstant, a les cèl·lules germinals és molt comuna l'existència d'isoenzims glucolítics específics. Alguns d'ells són productes de gens expressats només en aquests tipus cel·lular, mentre que altres provenen de gens que encara que són expressats en cèl·lules somàtiques, per fenòmens d'splicing alternatiu, donen lloc a trànscrips específics del teixit germinal. Altrament, hi ha enzims que presenten característiques estructurals o funcionals diferents en aquestes cèl·lules de les que presenten a les cèl·lules somàtiques, per exemple l'enzim GAPDHs es diferencia de la isoforma somàtica per un domini ric en residus prolines a l'extrem N-terminal que l'enzim GAPDH somàtic no el presenta (Eddy, 2002; Welch et al., 2006). Molts dels gens que són expressats a les cèl·lules somàtiques, solen estar en forma inactiva a les cèl·lules germinals i és el seu corresponent homòleg, específic del llinatge germinal, el que s'hi expressa. Alguns exemples d'isoenzims específics de la línia germinal serien l'hexocinasa-1s (HK-1s) o la gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH-S); entre d'altres, veure Taula 2 de la introducció general de la present memòria de tesi doctoral (Broceno et al., 1995; Gillis and Tamblin, 1984; Mori et al., 1998; Mori et al., 1992).

Una altra característica metabòlica de les cèl·lules espermatogèniques en desenvolupament és la plasticitat a l'hora d'incorporar substrats que s'integren a diferents nivells del flux glucolític per

obtenir l'energia necessària per produir els espermatozoides (Bajpai et al., 1998). En general, la direcció i velocitat de la via glucolítica ve determinada per cicles de substrats. Mitjançant variacions tant dels enzims que hi participen com de la concentració dels seus efectors al·lostèrics es controla la via. Un punt central de control resideix en els enzims PFK-1 i FBPasa-1, essent la Fru-2,6-P<sub>2</sub> l'activador al·lostèric més potent de la PFK-1 i inhibidor de la FBPasa-1. Així, variacions en la concentració d'aquest metabòlit regulen l'activitat de la PFK-1 en els teixits glucòlisi dependents i, indirectament, regulen la intensitat i la direcció de la glucòlisi i la gluconeogènesi mitjançant l'efecte dual i oposat sobre la PFK-1 i la FBPasa-1 (Pilkis et al., 1995). Aquest metabòlit és sintetitzat per l'enzim bifuncional PFK-2/FBPasa-2.

En el testicle humà i de rata s'expressen dos isoenzims de la proteïna PFK-2/FBPasa-2: uPFK-2 i tPFK-2, codificats pels gens: *Pfkfb3* i *Pfkfb4*, respectivament (Duran et al., 2008; Manzano et al., 1999; Riera, 2002). El gen *Pfkfb4* codifica per a una proteïna que inicialment va ser localitzada a testicle (Manzano et al., 1999; Sakata et al., 1991), tot i que posteriorment també s'ha trobat expressada en diverses línies tumorals (Bobarykina et al., 2006; Minchenko et al., 2005a; Minchenko et al., 2005c). El gen *Pfkfb3*, tot i expressar-se en el testicle, codifica per una proteïna que està àmpliament expressada en la majoria de teixits, sobretot en els proliferants (Atsumi et al., 2002; Bando et al., 2005; Chesney, 2006; Duran et al., 2008; Hamilton et al., 1997; Minchenko et al., 2004; Minchenko et al., 2005a; Minchenko et al., 2005c; Navarro-Sabate et al., 2001; Obach et al., 2004; Riera et al., 2002; Riera et al., 2003; Telang et al., 2006).

En el present treball de tesi doctoral es va comprovar que durant la formació i la maduració testicular a la rata, les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) hi són presents des dels últims períodes gestacionals (E18-E21) fins a la maduresa sexual de l'individu (en el nostre model d'estudi: 90 dies postpart). La composició cel·lular de l'epiteli seminífer pateix múltiples transformacions al llarg de la vida de l'animal, tant a l'etapa prenatal com a la postnatal. A l'etapa prenatal, les cèl·lules de Sertoli comencen a proliferar a partir del dia 18 de gestació fins al naixement, mentre que les cèl·lules germinals romanen quiescents. En aquest període gestacional l'expressió del gen *Pfkfb4* va variar mínimament. Contràriament, l'expressió del gen *Pfkfb3* es va observar que va incrementar progressivament a mida que s'apropava el moment del part. Per a *Pfkfb3*, prèviament, el nostre laboratori havia fet un estudi similar durant el desenvolupament del cervell de rata (Goren et al., 2000), en aquest estudi es va descriure que *Pfkfb3* s'expressava des del període embrionari fins a l'edat adulta, amb un màxim el dia previ al naixement que s'acompanyava també d'un increment en la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> i de l'activitat PFK-2. A la bibliografia es descriu que la Fru-2,6-P<sub>2</sub> també

s'incrementava en els fetges fetals prèviament al naixement per caure poc després, coincidint amb una hipoglucèmia neonatal (Hamer and Dickson, 1987; Schubert et al., 1983).

Durant l'etapa postnatal, la composició cel·lular dels túbuls seminífers es manté constant fins al sisè dia postpart. És en aquest moment quan els espermatogonis comencen a proliferar per donar els espermatòcits que, al seu torn, es dividiran per donar les espermatides rodones. Aquestes últimes es detecten a partir del dia 18 i arriben al nombre màxim als 30 dies, moment en que també apareixen les primeres espermatides en elongació. Als 45 dies es considera que el testicle ja és adult i a l'epiteli seminífer s'hi troben representats tots els tipus cel·lulars germinals, fins i tots els espermatozoides (Bellve et al., 1977a; Bellve et al., 1977b). Les cèl·lules de Sertoli també proliferen, des del dia 5 fins al dia 20 postpart.

Durant tota l'etapa postnatal, així com en el testicle adult, vàrem trobar expressats tots dos gens: *Pfkfb4* i *Pfkfb3*, tot i que en el teixit adult és el gen *Pfkfb4* qui ho feia en més quantitat. En concret, l'expressió del gen *Pfkfb4* es va mantenir constant des del naixement fins a la pubertat de l'individu. Es tractaria d'una expressió equiparable a aquella que presentava al final de la gestació i en el moment del part. En arribar a l'edat adulta va presentar un pic d'expressió. D'altra banda, en el mateix període postnatal, el gen *Pfkfb3* va mostrar dos pics importants d'expressió. El primer en el dia 6 postpart i el segon, més pronunciat, en el dia 30 postpart.

Considerant els canvis de l'epiteli seminífer paral·lelament amb l'expressió dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4* en l'animal prepúber, per una banda es podrien relacionar els pics en l'expressió del gen *Pfkfb3* amb les ones proliferatives de les cèl·lules germinals a l'espermatogènesi: els espermatogonis comencen a dividir-se al sisè dia postpart que coincidiria amb el primer pic d'expressió del gen *Pfkfb3*. I el segon pic en l'expressió de *Pfkfb3* coincidiria amb l'increment de les espermatides rodones als 30 dies postpart. Per altra banda, l'augment progressiu en l'expressió del gen *Pfkfb4* es podria relacionar amb l'increment en el nombre de cèl·lules germinals.

Els resultats del present treball de tesi doctoral han permès concretar la localització cel·lular d'ambdues proteïnes. La proteïna uPFK-2 (PFKFB3) es va localitzar tant a les cèl·lules de Sertoli com a les cèl·lules germinals. D'entre elles és present de forma majoritària a les cèl·lules germinals premeiòtiques. Mentre que la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) només va ser localitzada a les cèl·lules germinals i de forma majoritària a les cèl·lules espermatogèniques postmeiòtiques on es distribuïa dibuixant una mitja lluna, recordant la morfologia típica del cap dels espermatozoides de rata. A partir d'aquests resultats ens vam preguntar el perquè d'aquesta ubicació. Quina importància deu tenir la distribució dels isoenzims uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en les cèl·lules testiculars i quines avantatges metabòliques podrien oferir a les cèl·lules on un i altre es localitzaven.

L'expressió del gen *Pfkfb3* seria necessària en les cèl·lules de Sertoli i en aquelles cèl·lules que es troben en proliferació: els espermatogonis i els espermatòcits. Aquests tres tipus cel·lulars comparteixen la característica de ser altament glucolítics (Bajpai et al., 1998; Erkkila et al., 2002; Nakamura et al., 1984a; Riera et al., 2001). Les cèl·lules de Sertoli necessiten tenir la glucòlisi molt activada per produir el lactat que serà utilitzat per les cèl·lules germinals postmeiòtiques per generar ATP. A més, el lactat també funciona com a factor de supervivència en les cèl·lules germinals postmeiòtiques, incrementant la síntesi proteica, la de RNA i inhibint l'apoptosi. Però els mecanismes pels quals és capaç d'aturar l'apoptosi no estan gaire clars (Bajpai et al., 1998; Erkkila et al., 2002; Griswold, 1998; Nakamura et al., 1984b; Riera et al., 2001). Igualment, les cèl·lules germinals necessiten tenir alt el flux glucolític per poder mantenir el seu elevat potencial proliferatiu. La presència de uPFK-2 (PFKFB3) en aquests tipus cel·lulars seria important per afavorir/potenciar la via glucolítica, perquè de tots els isoenzims de la família de la PFK-2 és el que presenta la major activitat cinasa (en humans la relació cinasa:fosfatasa és de 710), fent que sigui un enzim principalment glucolític. D'aquesta manera, en aquelles condicions en que la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) estigués expressada, la concentració de Fru-2,6-P<sub>2</sub> s'elevaria, activant l'enzim PFK-1 per impulsar la via glucolítica front la gluconeogènica (Okar et al., 2001).

L'expressió del gen *Pfkfb4* resultaria necessària durant el procés de diferenciació germinal, l'espermiogènesi, per a produir espermatozoides funcionals. Les cèl·lules postmeiòtiques metabòlicament es caracteritzen per una reduïda activitat dels enzims glucolítics i per dependre bàsicament del lactat exogen com a font energètica, que s'incorpora a la cèl·lula mitjançant els transportadors MCT1 i 2 (Boussouar et al., 2003). Posteriorment, serà metabolitzat a través de la fosforilació oxidativa. A més, aquestes cèl·lules tenen certa activitat FBPasa-1 (Yanez et al., 2007), per tant, una part del lactat produït per les cèl·lules de Sertoli podria regenerar la glucosa-6-P i així reomplir els dipòsits de NADPH a través de la via de les pentoses fosfat durant l'espermiogènesi. Per aquestes raons, les cèl·lules postmeiòtiques necessiten tenir un enzim que pugui tant dirigir la via cap a la glucòlisi com a la gluconeogènesi amb facilitat. La presència de l'isoenzim tPFK-2 (PFKFB4) en aquestes cèl·lules, amb una relació cinasa/fosfatasa pràcticament en equilibri (en concret de 0.9 a humans) (Okar et al., 2001), el fa idoni per dirigir el sentit de la via glucolítica. En funció de la regulació transcripcional i/o postraduccional i de l'activitat enzimàtica de tPFK-2 (PFKFB4) es degradarà la glucosa o es regenerarà glucosa-6-P.

Així, la via de la glucòlisi presentaria dos cicles de substrats importants per la seva regulació a les cèl·lules espermatogèniques, un a nivell de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 i l'altre a nivell dels enzims PFK-1 i FBPasa-1, que seria de retruc controlat pel primer.

Si ara ens fixem en els espermatozoides; es tracta de cèl·lules morfològicament molt diferenciades i funcionalment molt polaritzades. Una de les seves característiques principals és que tenen molt poc citoplasma, per tant gairebé no tenen capacitat de translocar metabòlits d'una regió a una altra i, al tenir la cromatina molt compactada, són inactius transcripcionalment, per això no poden fabricar proteïnes de novo en resposta a canvis ambientals. En conseqüència, les proteïnes i/o mRNA que hi són presents provenen de síntesi prèvies a les espermàtides rodones (Travis et al., 2001). La marcada morfologia dels espermatozoides comporta que les vies metabòliques i les de senyalització també estiguin compartimentades (veure Figures 8 i 9 de la introducció). Analitzant l'expressió dels enzims uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) durant la maduració dels espermatozoides de rata, és a dir a l'espermioogènesi, es va evidenciar que la proteïna uPFK-2 es trobava expressada en els espermatozoides immadurs mentre que la proteïna tPFK-2 ho feia en els madurs i funcionals, on es localitzava al cap i també a la peça principal del flagel, semblant a d'altres enzims glucolítics, entre ells en destaquen l'HK-1s o la GAPDHs (Eddy et al., 2003; Mori et al., 1998; Storey and Kayne, 1975; Travis et al., 1998; Travis et al., 2001).

Per a diversos teixits en proliferació i diferenciació el nostre laboratori ja ha demostrat que durant la diferenciació d'aquests, la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) disminueix la seva expressió en benefici d'un increment d'expressió d'algun altre isoenzim de la família de la PFK-2/FBPasa-2. En el cas de la diferenciació miogènica, l'enzim uPFK-2 (PFKFB3) s'expressa en elevats nivells durant la fase de proliferació, però quan les cèl·lules comencen a diferenciar-se disminueix per degradació via proteosoma. Aleshores, en el teixit muscular adult es troba expressat, de forma principal, l'enzim M-PFK-2 (PFKFB1) (Riera et al., 2003). A més, recentment, el nostre laboratori ha demostrat una conducta similar durant la diferenciació dels hepatòcits (Duran et al., 2008). El decaïment en l'expressió de l'enzim uPFK-2 (PFKFB3) durant l'espermioogènesi en favor de l'enzim tPFK-2 (PFKFB4) refermaria, juntament amb els resultats durant la diferenciació del múscul i del fetge i relacionant les ones proliferatives en el testicle en formació amb els pics en l'expressió del gen *Pfkfb3*, el paper clau de l'enzim uPFK-2 (PFKFB3) en els sistemes proliferants.

Així mateix, s'han obtingut uns resultats similars mitjançant un estudi de l'expressió dels isoenzims uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en biòpsies de tumors germinals humans. En aquells tumors que es caracteritzen per una gran velocitat proliferativa i es troben més desdiferenciats, l'enzim que majoritàriament es va detectar era uPFK-2 (PFKFB3), mentre que tPFK-2 (PFKFB4) es va detectar de forma minoritària.

## 4.2.- Regulació transcripcional de *Pfkfb4* en les cèl·lules germinals, relació amb la hipòxia.

El fet de que l'espermatogènesi es produeixi de forma ordenada en el temps, implica canvis en l'expressió gènica per poder afrontar satisfactòriament els fenòmens de proliferació (per mitosi i meiosi) i diferenciació que tenen lloc. Per tant, es necessita un programa regulador molt precís (comparable amb el que es dona durant els primers estadis de formació dels embrions) que coordini i controli els patrons d'expressió dels diferents gens implicats en tot el procés de forma sincrònica amb la diferenciació dels espermatòcits i les espermatides (Eddy, 2002; Kleene, 2001). Així doncs, més de 160 gens modifiquen el seu comportament durant la proliferació dels espermatòcits. Aquest canvi de conducta indicaria que aquests gens deuen ser crucials per a la correcta progressió de les fases meiòtiques i postmeiòtiques. D'entre aquests, 51 corresponen a gens expressats preferentment als espermatòcits i 109 serien expressats preferentment a les espermatides, però només es coneix la funció biològica de la meitat d'ells (31 en el cas dels espermatòcits i 50 en les espermatides). La majoria de gens sobreexpressats a les espermatides tenen poca o cap representació als espermatogonis (Pang et al., 2005; Rossi et al., 2004). Entre el centenar de gens modificats molts codifiquen per enzims metabòlics, alguns d'ells es recullen a les següents taules:

### A) Espermatòcits vs Espermatogonis:

Nom	Símbol	Notes	Vegades d'expressió en els espermatòcits vs els espermatogonis
Lactat deshidrogenasa-C, específic de la línia germinal	LDH-C	Absent als espermatogonis (glucòlisi/gluconeogènesi)	3565
Fosfoglicerat mutasa muscular	PGM-M	Absent als espermatogonis (glucòlisi/gluconeogènesi)	1260
Fructosa bisfosfatasa-1	FBPasa-1	Absent als espermatogonis (glucòlisi/gluconeogènesi)	401
Fosfofructocinasa-1	PFK-1	Absent als espermatogonis (glucòlisi/gluconeogènesi)	12
Fosfoglicerat cinasa-2	PGK-2	Absent als espermatogonis	33
Nom	Símbol	Notes	Vegades d'expressió en els espermatogonis vs els espermatòcits
Piruvat deshidrogenasa E1 2	PDHA-2	Present als espermatogonis	30
Lactat deshidrogenasa-1A	LDH-A	Present als espermatogonis (glucòlisi/gluconeogènesi)	11

**TAULA 4.1A. Gens glucolítics amb variacions en llurs expressions durant l'espermatogènesi.**  
Comparativa d'expressió entre els espermatogonis i els espermatòcits.

**B) Espermatides vs Espermatòcits:**

Nom	Símbol	Notes	Vegades d'expressió en les espermatides vs els espermatòcits
Glucosa fosfat isomerasa-1	GPI-1	Augmentat en espermatides (glucòlisi/gluconeogèsi)	5
Bisfosfoglicerat mutasa	BFGM	Augmentat en espermatides (glucòlisi)	3
Citocrom c	Cyt c	Augmentat en espermatides (transportador d'electrons)	3
Sodi Potassi ATPasa	Na+/K+ ATPasa	Augmentat en espermatides (Intercanviador Na+/K+ ATPasa)	3
Nom	Símbol	Notes	Vegades d'expressió en els espermatòcits vs les espermatides
Lactat deshidrogenasa 2B	LDH-2B	Augmentat en espermatòcits (glucòlisi)	3

**TAULA 4.1B. Gens glucolítics amb variacions en llurs expressions durant l'espermatogènesi.**

Comparativa d'expressió entre els espermatòcits i les espermatides.

Adaptat de Pang et al., 2005; Rossi et al., 2004.

L'augment de la transcripció a les espermatides rodones coincideix amb l'inici de la diferenciació cap a les espermatides en elongació. Es tractaria d'un mecanisme que té la finalitat d'assegurar que hi hagin transcrits disponibles durant l'espermioogènesi. En el transcurs de l'espermioogènesi, es produeix una reducció gradual de la transcripció a mida que el genoma haploide es condensa (Kimmins et al., 2004). L'increment en l'expressió dels gens metabòlics indica una alta demanda energètica per part de les espermatides en comparació amb els espermatòcits. Requerida, en gran part, per fer front a la remodelació morfològica de l'espermioogènesi. Aquesta és una característica conservada entre diferents espècies de mamífers (humans, rata, ratolí) i fins i tot també s'ha trobat conservada en el nemàtode *C.elegans* (Reinke et al., 2000).

Altres gens que també es troben més expressats a les espermatides, a part dels metabòlics, són els que codifiquen per proteïnes cinases i fosfatases de vies de senyalització, junt amb d'altres que es dediquen al transport intracel·lular o al recanvi proteic (Pang et al., 2005).

L'increment en l'expressió del gen *Pfkfb4* que es va observar durant el desenvolupament postnatal del testicle de rata podria estar relacionat amb un increment en el nombre d'espermatides. A més, es va acompanyar d'una disminució progressiva en l'expressió de *Pfkfb3* que al final va desaparèixer als espermatozoides. Aquests resultats podrien indicar que l'expressió del gen *Pfkfb4* estaria sota el control d'un promotor amb resposta a combinacions úniques de factors de transcripció

pròpies del testicle. Va ser sota aquesta hipòtesi que vàrem decidir abordar el segon dels objectius d'aquest projecte de tesi doctoral i vam estudiar les característiques generals del promotor *Pfkfb4* en dues línies cel·lulars germinals, GC-1spg (espermatogoni) i GC-2spd(ts) (espermatòcit).

En el segon capítol de resultats presentats en aquesta memòria de tesi es destacava que la unitat mínima promotora del gen *Pfkfb4* no contenia caixes TATA que activessin la transcripció basal. No obstant, en aquesta seqüència es concentraven múltiples caixes GC i possibles llocs consens per als factors Sp-1 i ETF, els quals, segons està descrit a la bibliografia, poden conduir la transcripció basal de gens sense caixes TATA (Hale and Braithwaite, 1999; Kageyama et al., 1989; Maeda et al., 2002). Aquest tret el comparteix amb altres gens de la família, en concret amb *Pfkfb2* i *Pfkfb1* (la isoforma hepàtica) que tampoc presenten caixes TATA actives que condueixin la seva transcripció basal (Navarro-Sabaté et al., 2001). D'altra banda, a la regió promotora del gen *Pfkfb4* també vàrem trobar seqüències d'unió consens a diferents factors de transcripció. En destaquem les seqüències de resposta a la hipòxia, a hormones esteroïdals, a les proteïnes Sox i al protooncogen c-Myc. Algunes d'aquestes seqüències consens ja s'havien identificat també en els altres gens que codifiquen pels diferents isoenzims de la PFK-2/FBPasa-2, com són els elements d'unió a Sp-1, Ap-2, HRE, i els elements de resposta a hormones esteroïdals (Fukasawa et al., 2000; Fukasawa et al., 2004; Navarro-Sabaté et al., 2001; Obach et al., 2004).

#### **4.2.1.- *Pfkfb4* i la hipòxia testicular.**

La resposta a hipòxia dels gens *Pfkfb* ha estat ben demostrada: en concret, en sistemes tumorals (Fukasawa et al., 2004; Minchenko et al., 2003; Obach et al., 2004) i en diversos teixits de rata sotmesos a baixes pressions d'oxigen pels quatre diferents gens *Pfkfb 1, 2, 3* i *4* (Minchenko et al., 2003). Paral·lelament a la realització d'aquesta tesi, el grup de Minchenko va descriure que el gen *Pfkfb4* respon a la hipòxia en diversos tumors digestius i de mama (Minchenko et al., 2004; Minchenko et al., 2005a; Minchenko et al., 2005c). Però, entre aquests no hi havia cap resultat del seu comportament en un sistema cel·lular derivat del testicle.

Cal recordar que les pressions parcials d'oxigen al lumen i a l'epidídim són considerablement baixes, quasi hipòxiques, si es comparen amb la zona basal. Degut, d'una banda, a l'elevada distància de difusió des del torrent sanguini fins al lumen i de l'altra seria resultat de l'elevada taxa de consum d'oxigen per part de les cèl·lules germinals que hi proliferen. Encara més, les transformacions per les que passa l'espermatozoide durant la capacitació, la motilitat, la reacció de l'acrosoma i la fertilització



són processos dependents de l'aportament energètic via la glucòlisi anaeròbica i tenen lloc en condicions, gairebé, anòxiques (Wenger and Katschinski, 2005). En conseqüència, seria previsible que el gen *Pfkfb4* estigués capacitat per respondre a aquesta hipòxia testicular.

La resposta hipòxica a les cèl·lules eucariotes depèn del factor induïble per hipòxia: **HIF1** (Semenza, 2007; Wenger and Katschinski, 2005). A part del propi factor HIF-1, s'han descrit que altres factors de transcripció que també poden respondre a la hipòxia, controlant la resposta dels seus gens diana a les baixes pressions d'oxigen (Cummins and Taylor, 2005). En aquest treball ens hem centrat en l'estudi de l'efecte dels factors HIF1, Sp1 i c-Myc sobre *Pfkfb4* en situacions d'hipòxia.

El factor induïble per hipòxia, HIF1, és el regulador transcripcional més important en l'homeòstasi de l'oxigen de multitud de gens que estan involucrats en l'eritropoesi, l'angiogènesi, la supervivència i el metabolisme cel·lular (Minchenko et al., 1994a; Minchenko et al., 1994b; Salceda and Caro, 1997; Semenza, 2003; Semenza et al., 1994; Wang and Semenza, 1996). D'entre els gens glucolítics diana de HIF1 estan els transportadors de glucosa, i la majoria dels enzims glucolítics com són uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4), l'enzim LDH (Semenza, 2003). A més d'afavorir la via glucolítica, HIF 1 limita l'entrada del piruvat al cicle de Krebs per dos mecanismes: activa l'enzim PDK1 que fosforila i inhibeix l'enzim PDH i també inhibeix la biogènesi mitocondrial. D'aquesta manera, HIF1 aconsegueix augmentar el flux glucolític i afavorir la conversió de piruvat a lactat (Zhang et al., 2007). Degut a la importància del factor HIF 1 en nombrosos processos biològics, l'expressió i l'activitat de la subunitat HIF1 també es regula per mitjà de les vies de transducció de senyals com PI3K/AKT i ERK/MAPK (Semenza, 2002).

Amb els resultats que s'han presentat en el segon capítol d'aquesta memòria, vàrem posar de manifest la importància de l'element HRE situat a -404 en la resposta del gen *Pfkfb4* a la hipòxia en les cèl·lules germinals. Es podria evidenciar una relació entre el gen *Pfkfb4* i la hipòxia en l'espermatogènesi, tot i que encara falten alguns estudis complementaris per acabar de confirmar la contribució d'aquesta seqüència HRE com per exemple provar com desapareix la resposta a HIF en mutar aquesta seqüència a -404, realitzar un assaig d'EMSA usant dita seqüència com a oligonucleòtid per poder demostrar una unió específica del factor HIF 1 en aquesta regió promotora. Paral·lelament, el grup de Minchenko també va assenyalar que el mateix element HRE situat a -404 (posició 422-429 bp upstream del codó ATG (Minchenko et al., 2004)) seria un bon candidat per conduir la resposta hipòxica del promotor *Pfkfb4* en línies cel·lulars tumorals.

A la literatura està descrit que les seqüències de DNA adjacents al core HRE acostumen a contenir seqüències d'unió per a factors de transcripció addicionals. Aquests no són necessàriament induïbles per la hipòxia, però poden amplificar-ne la resposta del gen diana o bé poden proporcionar

especificitat tissular (Wenger et al., 2005). En la seqüència promotora del gen *Pfkfb4*, envoltant les posicions HRE vàrem identificar nombrosos elements de resposta al factor Sp-1. Va resultar ser en els primers -200 nucleòtids, colocalitzant en part amb la unitat mínima promotora, on més es concentraven els elements GC (o caixes GC). El factor Sp1 podria reconèixer les caixes GC i unir-s'hi per controlar l'activitat transcripcional basal. Aquest paper del factor Sp1 sobre la transcripció basal ha sigut descrit també per un altre enzim glucolític, que a l'igual que *Pfkfb4*, s'expressa específicament als espermatòcits i a les espermatides durant les últimes fases de la producció dels espermatozoides: l'enzim LDH-C (Yang and Thomas, 1997).

Alguns dels gens que responen a la hipòxia, com *Pfkfb3* (Obach et al., 2004) o Eritropoietina (EPO) (Sanchez-Elsner et al., 2004) també tenen en la seva seqüència promotora elements de resposta al factor de transcripció Sp-1. Kaluz i els seus col·laboradors, van demostrar que la resposta hipòxica del gen que codifica per l'Anhidrasa carbònica IX és diferent segons si la hipòxia és suau o severa. Si la hipòxia és suau, Sp1 resultaria absolutament necessari per a què la resposta es produeixi. Mentre que si la hipòxia és severa, Sp1 augmentaria de forma significativa la resposta hipòxia mitjançada per HIF1 (Kaluz et al., 2003).

Els resultats obtinguts de l'efecte de Sp1 sobre la transcripció del gen *Pfkfb4* en hipòxia, més les dades prèvies de Kaluz i col·laboradors (existència d'una possible relació entre els factors Sp1 i HIF1 per tal d'obtenir respostes a diferents situacions hipòxiques) ens va permetre plantejar-nos una hipòtesi sobre el que podria estar passant amb el gen *Pfkfb4* als espermatòcits. En aquest sistema, Sp1 podria actuar com a enhancer o facilitador de l'activitat transcripcional del gen *Pfkfb4* davant la hipòxia. Altres gens que responen a la hipòxia, per exemple VEGF o LDH-A, també tenen com a cofactor o trans-activador a Sp1, el qual podria interaccionar amb els elements HRE o amb la proteïna HIF 1 per incrementar, encara més, l'activitat transcripcional d'aquests gens en situacions on les pressions d'oxigen disminueixen (Shi et al., 2001; Shim et al., 1997).

D'altra banda, però, també s'ha de tenir en compte que tant en el testicle humà com en el de ratolí, a més del factor ubic HIF1, que s'expressa principalment al nucli dels espermatòcits i minoritàriament a les espermatides; també s'ha identificat l'existència d'una subunitat HIF1 $\alpha$  específica de testicle (**HIF 1 $\alpha$  Te**), la qual es localitza a les espermatides abans d'esdevenir espermatozoides madurs (Depping et al., 2004; Marti et al., 2002). No obstant, s'ha descrit que HIF1 Te humà actuaria com un dominant negatiu, que no podria unir-se al DNA però que en hipòxia sí que podria dimeritzar amb la subunitat ARNT (o HIF 1 $\beta$ ), reduint-ne la disponibilitat d'aquesta última pel factor ubic HIF 1 $\alpha$ . Com a conseqüència, la presència de HIF 1 $\alpha$ Te en hipòxia comportaria que es perdés l'activació dels gens diana per part del factor HIF1 ubic. D'aquesta manera s'aconseguiria

silenciar gens, molts dels quals serien els enzims glucolítics d'expressió ubiqua (Depping et al., 2004). Aquesta hipòtesi, encara no testada, podria ser extrapolable per al gen *Pfkfb3*, que codifica per l'isoenzim d'expressió ubiqua activable per la hipòxia: uPFK-2 (PFKFB3) (Obach et al., 2004). Així doncs, segons aquesta hipòtesi es podria explicar que a testicle (en concret a les espermatides) hi hagués una disminució de l'expressió de *Pfkfb3* en el mateix moment que s'iniciaria l'increment en l'expressió de *Pfkfb4* mentre l'ambient hipòxic s'accentua.

Segons el model que hipotetitzem, l'activació del gen *Pfkfb4* a les cèl·lules postmeiòtiques (espermatides), que es diferencien en un ambient d'hipòxia severa, podria ser deguda a la interacció del dímer format entre HIF1 $\alpha$ Te/HIF1 $\beta$  amb el factor Sp-1. Segons es representa a la Figura 4.1A, en la seqüència promotora del gen *Pfkfb4*, el factor Sp-1 podria reconèixer les caixes GC que envolten els elements HRE i unir-s'hi. Si Sp-1 també estigués unit al factor HIF1, llavors, la seva unió a les caixes GC al seu torn facilitaria la unió a la seqüència promotora de l'heterodímer format pel dominant negatiu HIF1 $\alpha$ Te i HIF1 $\beta$  i sense necessitat de la isoforma general d'HIF 1 $\alpha$ .

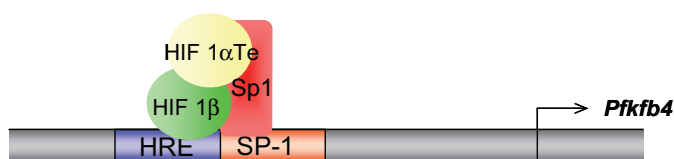


FIGURA 4. 1A. Hipòtesi de la possible interacció entre els factors de transcripció HIF 1 $\alpha$ Te/HIF1 $\beta$  i Sp-1 en el promotor del gen *Pfkfb4*.

Com a conseqüència, a les espermatides es podria activar la transcripció del gen *Pfkfb4* en resposta a la disminució de la concentració d'oxigen. A més, la proteïna Sp1 també funciona com a estabilitzadora del complex iniciador de la transcripció (Gill et al., 1994) perquè estaria interaccionant amb alguns dels cofactors transcripcionals. Aquesta segona interacció de Sp1 també ajudaria en l'activació del gen *Pfkfb4* a les cèl·lules postmeiòtiques humanes.

En el promotor del gen *Pfkfb3*, tot i que també té seqüències GC que podrien ser reconegudes pel factor de transcripció Sp-1, segons es mostra a la Figura 4.1B, les seqüències HRE que s'han demostrat actives (localitzades entre els nucleòtids -1279 i 1288) no presenten caixes GC pròximes (Obach et al., 2004).



FIGURA 4.1.B. Hipòtesi de la possible falta d'interacció entre els factors de transcripció HIF 1 $\alpha$ Te/HIF 1 $\beta$  i Sp-1 en el promotor del gen *Pfkfb3*.

Amb aquestes dades i segons la hipòtesi anterior, en reduir-se la pressió d'oxigen, el factor HIF1 $\alpha$ Te (què és un dominant negatiu) reclutaria a HIF1 $\beta$  en detriment de la disponibilitat d'aquest últim pel factor HIF 1 $\alpha$  ubic. Llavors el dímer format pel dominant negatiu podria unir-se a la proteïna Sp1. Podria suposar-se també que, al no haver-hi caixes GC properes als elements HRE, el complex multiproteic format pel dímer HIF1 $\alpha$ Te/HIF1 $\beta$  amb el factor Sp-1 no seria capaç d'unir-se al promotor, i *Pfkfb3* podria ser progressivament silenciada a mida que avança l'espermatogènesi. Aquest podria ser un possible mecanisme per silenciar el gen *Pfkfb3* a les cèl·lules germinals postmeiòtiques.

Dins el lumen tubular, el microambient hipòxic en que les cèl·lules germinals proliferen és molt semblant al que estan sotmeses les cèl·lules tumorals en creixement. El descens en la disponibilitat d'oxigen que es dona en els túbuls seminífers, estimula a les cèl·lules a consumir glucosa i produir lactat. Per altra banda, la capacitat de les cèl·lules proliferants de créixer en un ambient hipòxic, segons es descriu en el model de Koshiji et al., (2004) radica en gran part de la capacitat d'interaccionar entre el factor induïble per la hipòxia HIF1 i el protooncogen c-Myc. El factor de transcripció c-Myc regula el creixement i l'entrada en el cicle cel·lular. S'expressa a la fase G1 i permet l'entrada de la cèl·lula a la fase S actuant sobre les ciclines i les CDK. Durant l'espermatogènesi es troba expressat als espermatogonis (a l'última fase de la divisió mitòtica) i als espermatòcits (a la profase de la meiosi) (Teng and Vilagrasa, 1998; Wolfes et al., 1989). També pot actuar sobre gens glucolítics, per exemple: HK-2, ENO-1, PFK-M, GAPD, LDH-A, els quals també es troben regulats per HIF1 (Kim et al., 2004; Osthus et al., 2000; Shim et al., 1997). La proliferació requereix una gran quantitat de nucleòtids per tal de duplicar el genoma. Per tant, c-Myc reforçaria els efectes dels factors de creixement sobre el metabolisme glucídic i controlaria activitats metabòliques especialitzades i necessàries per tal de duplicar el genoma.

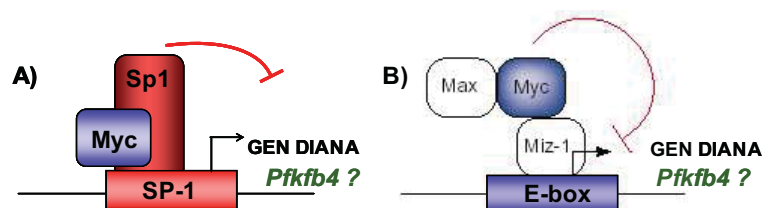
En els anteriors gens mencionats, igual que en el cas de *Pfkfb4*, les seqüències que reconeix c-Myc en el promotor es localitzen en una regió de 2 Kba de l'inici de transcripció. Però, al contrari del que va succeir amb *Pfkfb4*, els elevats nivells de c-Myc està descrit que incrementen la transcripció dels gens glucolítics esmentats. En conseqüència augmenta la glucòlisi en presència d'oxigen sense necessitat de la hipòxia (l'anomenat efecte Warburg). Malgrat que totes dues proteïnes (HIF 1 i c-Myc) poden reconèixer la mateixa seqüència en el promotor i tenen gens diana comuns, produeixen efectes oposats pel que fa a la proliferació cel·lular, la biogènesi mitocondrial o la reparació del DNA (Gordan et al., 2007b; Huang, 2008; Koshiji et al., 2004).

Així, per una banda, la inducció del factor HIF 1 per part de la hipòxia tindria com a resultat una aturada del cicle cel·lular degut a la inhibició transcripcional que fa de c-Myc, per competència amb c-Myc que provocaria que aquest no es pogués unir al promotor (Koshiji et al., 2004). Per l'altra

banda, la unió del factor HIF1 als elements HRE, podria desplaçar parcialment a c-Myc de les caixes E-box en models tumorals (Gao et al., 2007; Gordan et al., 2007b; Zhang et al., 2007). D'aquesta manera HIF1 podria contrarestar l'activitat de c-Myc desplaçant-lo del promotor i en conseqüència, regular els processos biològics abans esmentats: proliferació cel·lular, biogènesi mitocondrial i reparació del DNA.

En el promotor del gen *Pfkfb4*, ambdós factors transcripcionals podrien reconèixer la seqüència 5'- CGTG-3' però amb diferent resultat. En aquesta memòria de tesi s'ha descrit que en normòxia c-Myc inhibia l'expressió del gen *Pfkfb4* al model cel·lular d'espermatogoni, mentre que la hipòxia revertia parcialment aquest efecte. Quan es va eliminar la proteïna HIF 1 $\alpha$  del medi i es van sotmetre les cèl·lules a la hipòxia, es va mantenir la inhibició produïda per c-Myc sobre el promotor del gen *Pfkfb4*. La capacitat de contrarestar l'acció de c-Myc per la hipòxia, s'explicaria per un possible desplaçament de la unió de c-Myc al promotor *Pfkfb4*, degut a que ambdós factors transcripcionals competiren pels mateixos llocs d'unió i HIF1 $\alpha$  tindria un role autoritari en aquesta relació antagònica. Tot això estaria d'acord amb el mateix model que ha estat descrit pel gen p21 (Huang, 2008; Koshiji et al., 2004).

c-Myc també pot interaccionar amb el factor transcripcional Sp1, com a exemple de gen transcripcionalment regulat per la col·laboració d'aquest dos factors trobem p21 (Gartel et al., 2001). En aquest cas, s'ha descrit que un cop que c-Myc estés unit amb el factor Sp1 podria reprimir la transcripció de p21. D'aquesta manera, c-Myc actuaria com a repressor transcripcional de forma Sp1 dependent o de forma Sp1 independent. Els dos tipus de repressió que pot fer c-Myc s'esquemmatitzen a la Figura 4.2.



**FIGURA 4.2. Esquema dels mecanismes pels quals cMyc pot reprimir transcripcionalment.** A) Myc reprimeix la transcripció de gens diana interactuant amb la proteïna Sp1 sobre els elements Sp1 del promotor. B) Myc reprimeix la transcripció de gens diana interactuant amb els cofactors Max i Mzi en els elements E-box del promotor. Adaptat de Gartel and Shchors, 2003; Wanzel et al., 2003.

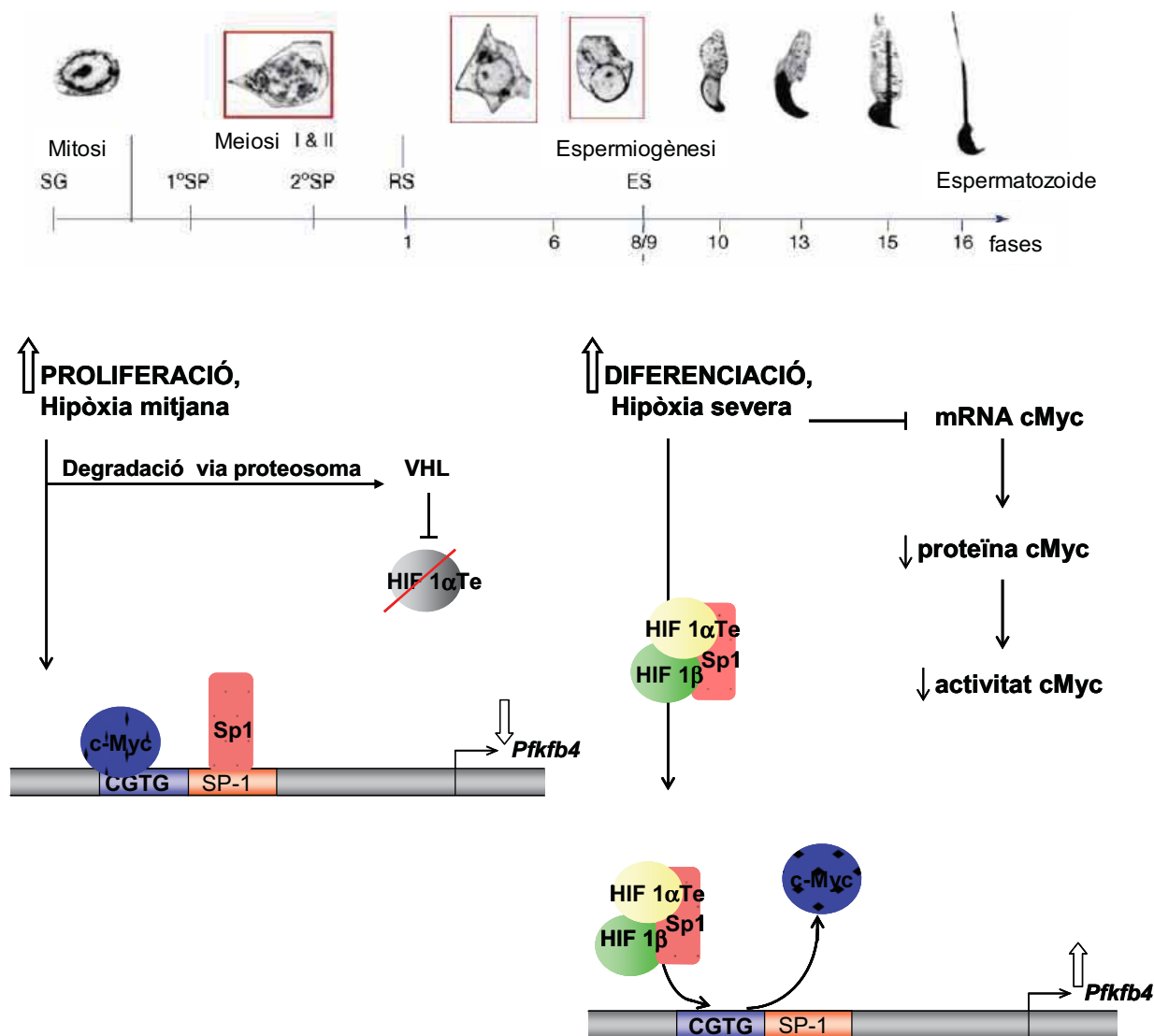
El primer tipus es donaria quan la proteïna Sp1 està unida a cMyc, llavors funcionaria com a cofactor i actuaria reconeixent els llocs d'unió Sp1 en el DNA (Gartel and Shchors, 2003; Gartel et al., 2001). El segon tipus tindria lloc quan c-Myc està unit amb un altre cofactor, com podria ser Max o Mzi,

llavors actuaria reconeixent els elements E-box al promotor per produir la inhibició transcripcional (Wanzel et al., 2003). Així, sobre la base de l'anterior esquema de mecanismes d'interaccions entre c-Myc i Sp-1 i a partir dels resultats del capítol 2 d'aquesta memòria, es podria dir que c-Myc, en el nostre model cel·lular de testicle, actuaria reprimint la transcripció el gen *Pfkfb4* i seria un fenomen del tipus dos, és a dir, Sp-1 independent. Quan es van sobreexpressar conjuntament els dos factors, la repressió es donava amb menys eficàcia si es comparava a aquella que s'aconseguia en sobreexpressar només c-Myc.

Arribats a aquest punt i d'acord amb els resultats obtinguts, es podria proposar un model integrador que expliqués els canvis d'expressió del gen *Pfkfb4* durant tot el procés de l'espermatogènesi. Aquest model es representa a la Figura 4.3 on es representa el model de la possible regulació transcripcional del gen *Pfkfb4* durant l'espermatogènesi degut a l'homeòstasi de l'oxigen en combinació amb la diferenciació cel·lular.

El factor Sp-1 s'expressa durant totes les fases de la formació dels espermatozoides (Persengiev et al., 1996; Thomas et al., 2005; Thomas et al., 2007). En els estadis inicials, quan té lloc la proliferació dels espermatogonis i espermatòcits, es podria suposar que c-Myc es trobaria unit al promotor del gen *Pfkfb4*, per inhibir-lo parcialment donat que Sp1 podria unir-se al promotor i promoure una petita transcripció en competència amb c-Myc.

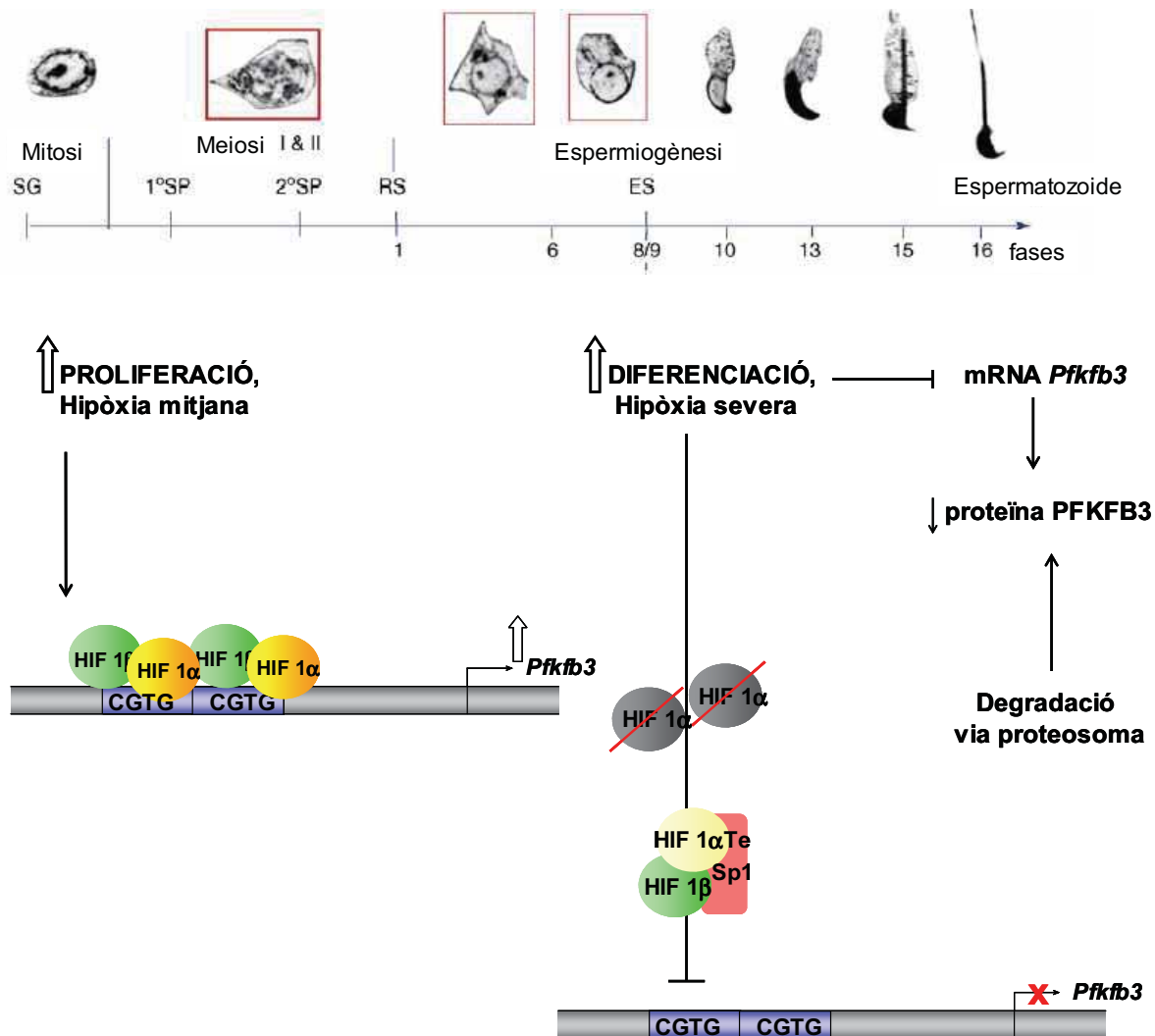
En una fase més avançada del procés espermatogènic la hipòxia intracel·lular augmenta i apareixen les primeres cèl·lules postmeiòtiques. En aquestes condicions es començaria a expressar el factor induïble per la hipòxia específic de testicle: HIF 1 $\alpha$ Te (que actuaria com un dominant negatiu), mentre disminuiria (perquè es degrada) la quantitat del factor HIF 1 $\alpha$  ubic que, a més, trobaria reduïda la quantitat de HIF 1 $\beta$  lliure i disponible per unir-s'hi, donat que estaria unit amb HIF 1 $\alpha$ Te. En aquest escenari, Sp-1 podria unir-se al dímer HIF1 $\alpha$ Te/HIF1 $\beta$  i, seguint el model que s'ha proposat a la Figura 4.1A, els permetria unir-se a l'element HRE del promotor del gen *Pfkfb4*. Com a resultat, desplaçarien a c-Myc de la unió a la seqüència E-box i activarien l'expressió del gen *Pfkfb4*. Per altra banda, la hipòxia més severa inhibiria la transcripció de c-Myc, implicant una reducció en la quantitat de proteïna de c-Myc i, conseqüentment, en l'activitat d'aquest factor transcripcional (Zhang et al., 2007). D'aquesta manera s'aconseguiria reduir l'acció negativa del protooncogen cMyc sobre *Pfkfb4*.



**FIGURA 4.3. Model proposat de la possible regulació transcripcional del gen *Pfkfb4* durant l'espermatogènesi a humans.** La transcripció del gen *Pfkfb4* estaria parcialment reprimida durant les ones proliferatives, és a dir, en els espermatogonis i espermatòcits. Seria gràcies a l'acció combinada de c-Myc (sobre la seqüència 5'-CGTG-3' del promotor) i de Sp-1 (sobre les seqüències riques en GC o SP-1 site) del promotor *Pfkfb4*. Així mateix, en aquestes condicions el dominant negatiu HIF1αTe seria reconegut per la proteïna VHL, que el conduiria a la degradació via proteosoma. Durant l'espermiogènesi, la hipòxia es torna més severa, HIF1αTe no es degradaria i dimeritzaria amb HIF1β. Es formaria, doncs, un complex estable al que podria unir-se Sp1. Aquest complex desplaçaria a c-Myc de la seqüència 5'-CGTG-3' del promotor per unir-s'hi. S'aconseguiria, d'aquesta manera, activar la transcripció del gen *Pfkfb4* en les espermatides rodones (Gordan et al., 2007b). Per altra banda, la hipòxia severa també actuaria sobre c-Myc per reduir la seva activitat: s'inhibiria la transcripció del mRNA de c-Myc, fet que comportaria una reducció en la quantitat de proteïna i, conseqüentment, en l'activitat d'aquest factor transcripcional (Zhang et al., 2007). Esquema de l'espermatogènesi modificat de Dufau and Tsai-Morris, 2007.

De forma paral·lela, també es podria suggerir un model integrador similar per a que expliqués els canvis d'expressió del gen *Pfkfb3* al llarg de tot el procés de l'espermatogènesi. El model de

regulació transcripcional durant l'espermatogènesi del gen *Pfkfb3* degut a l'homeòstasi de l'oxigen en combinació amb la diferenciació cel·lular es recull a la Figura 4.4.



**FIGURA 4.4. Model proposat de la possible regulació transcripcional del gen *Pfkfb3* durant l'espermatogènesi a humans.** La transcripció del gen *Pfkfb3* estaria altament activada durant les ones proliferatives, és a dir, en els espermatogonis i espermatòcits. Seria gràcies a la unió del dímer HIF1α/HIF1β a la seqüència 5'-CGTG-3' del promotor. Així mateix, en aquestes condicions HIF1αTe seria reconegut per la proteïna VHL, que el conduiria a la degradació via proteosoma. Durant la diferenciació espermiogènica, la hipòxia es torna més severa. Les espermatòcits deixarien de produir el factor HIF1α ubiqüinós per fabricar-ne l'específic de testicle, HIF1αTe. Aquest últim reclutaria HIF1β i Sp1, però en no haver seqüències Sp1 properes als llocs HRE actius en el promotor del gen *Pfkfb3*, aquest complex no s'hi podria unir i s'inhibiria la seva transcripció. Altres mecanismes que podrien silenciar en aquest ambient *Pfkfb3* serien la inhibició de la transcripció degut a la presència de factors que promouen la diferenciació, i la degradació de la proteïna via proteosoma (Duran et al., 2008; Riera et al., 2003). Esquema de l'espermatogènesi modificat de Dufau and Tsai-Morris, 2007.

En els estadis inicials del procés espermatogènic, durant la proliferació dels espermatogonis i espermatòcits, es podria suposar que la transcripció del gen *Pfkfb3* estaria altament activada gràcies a la unió del dímer HIF1α/HIF1β a la seqüència 5'-CGTG-3' del promotor. En progressar el procés



espermatogènic, la hipòxia intratubular i, per tant, la intracel·lular augmenten. En aquest microambient privat d'oxigen apareixen les primeres cèl·lules postmeiòtiques. També sota aquestes condicions es començaria a expressar el factor induïble per la hipòxia específic de testicle: HIF 1 $\alpha$ Te (dominant negatiu), mentre disminuiria (per degradació) la quantitat del factor HIF 1 $\alpha$  ubic. A més, aquelles proteïnes del factor ubic HIF 1 $\alpha$  que encara no estiguessin marcades per a degradar-se, trobarien reduïda la quantitat de HIF 1 $\beta$  lliure i disponible per unir-se'n, degut a que estaria unit amb HIF 1 $\alpha$ Te. El factor Sp-1 es trobaria expressat durant totes les fases de la formació dels espermatozoides (Persengiev et al., 1996; Thomas et al., 2005; Thomas et al., 2007) i podria unir-se al dímer HIF1 $\alpha$ Te/HIF1 $\beta$  seguint el model que hem proposat. Com hem comentat anteriorment a la Figura 4.1B, les seqüències HRE en el promotor del gen *Pfkfb3* que s'han demostrat que són actives (aquelles localitzades entre els nucleòtids -1279 i 1288) no presenten caixes GC pròximes (Obach et al., 2004). Llavors, el complex multiproteic format pel dímer HIF1 $\alpha$ Te/HIF1 $\beta$  amb el factor Sp-1 no seria capaç d'unir-se al promotor, i la transcripció del gen *Pfkfb3* podria ser progressivament silenciada a mida que avança l'espermatogènesi.

Aquest podria ser un possible mecanisme per silenciar el gen *Pfkfb3* a les cèl·lules germinals postmeiòtiques. En aquestes cèl·lules la reducció o l'aturada en la transcripció mitjançant repressors que reconeixen específicament el mRNA és un mecanisme de control transcripcional característic (Kleene, 2001). Altrament, existeixen altres mecanismes descrits de silenciament o de regulació negativa sobre la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) que es donen en els sistemes cel·lulars en diferenciació. Aquests són, d'una banda la degradació de la proteïna via proteosoma, i de l'altra la inhibició transcripcional del gen *Pfkfb3* produïda pels factors de diferenciació presents en el sistema cel·lular, tal com es va descriure pel nostre laboratori durant la miogènesi (Riera et al., 2003), o bé durant la diferenciació hepàtica (Duran et al., 2008).

### 4.3.- Regulació hormonal de *Pfkfb4* a les cèl·lules germinals i relació amb les cèl·lules de Sertoli.

Com hem dit en l'apartat anterior, els canvis en els patrons d'expressió gènica que es donen a l'espermatogènesi necessiten estar regulats de forma sincrònica amb les diferents fases del procés: la mitosi, la meiosi i la diferenciació cel·lular. El conjunt de resultats presentats sobre la regulació transcripcional del gen *Pfkfb4*, juntament amb les hipòtesis proposades sobre el control transcripcional de l'expressió dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4*, aporten informació sobre la importància que poden tenir diferents factors transcripcionals dependents de l'ambient, és a dir de la concentració d'oxigen, del tipus cel·lular, i de l'estat de diferenciació cel·lular sobre l'activitat transcripcional dels gens durant aquest procés.

No s'ha d'oblidar que, apart de la regulació transcripcional dels gens necessaris en cada etapa, la correcta progressió de l'espermatogènesi també depèn tant pel seu inici com pel seu manteniment del control hormonal. La regulació hormonal es produeix per l'acció combinada de les hormones FSH i Testosterona sobre les cèl·lules de Sertoli i no pas sobre les germinals, ja que als túbuls seminífers només les primeres presenten els receptors per aquestes hormones (Suarez-Quian et al., 1999; Walker and Cheng, 2005). La testosterona és necessària a les cèl·lules de Sertoli per a tres funcions principals: (1) el manteniment de la barrera Hemato-Testicular, (2) garantir la supervivència de les cèl·lules germinals durant la meiosi i (3) afavorir la sortida dels espermatozoides madurs cap al (Denolet et al., 2006; Holdcraft and Braun, 2004; Meng et al., 2005). Altrament, la presència d'estrògens en el testicle també és necessària per garantir la supervivència de les cèl·lules germinals (Pentikainen et al., 2000). Així per exemple s'ha vist que animals knockout pel receptor dels estrògens (ERko $\alpha$  i ERko $\beta$ ) presenten danys a l'espermatogènesi, consistents en anormalitats a les cèl·lules postmeiòtiques, conjuntament amb un augment de l'apoptosi (Lubahn et al., 1993; Robertson et al., 1999). Finalment, aquests danys porten a una reducció de la fertilitat de l'animal associada a l'edat. En el testicle, els receptors d'estradiol s'expressen a les cèl·lules somàtiques (Sertoli y Leydig) així com a les germinals (des dels espermatogonis fins a les espermàtides) (O'Donnell et al., 2001).

Tal i com s'ha descrit en els resultats del tercer capítol d'aquesta memòria de tesi, en el promotor del gen *Pfkfb4* vàrem localitzar possibles seqüències consens d'unió per a hormones esteroïdals, tant a andrògens (ARE) com a estrogens (ERE). Així i tot, en assajar l'efecte de la testosterona sobre el gen *Pfkfb4*, es va veure que concentracions de  $10^{-9}$  M de l'hormona no causaven cap resposta en el promotor *Pfkfb4* malgrat l'existència dels possibles elements ARE. En canvi, l'estradiol disminuïa la transcripció del gen *Pfkfb4* en les cèl·lules germinals derivades d'espermatogoni

(GC-1 spg). Aquests resultats podrien explicar, en part, que per immunofluorescència a les cèl·lules germinals premeiòtiques es detecti poca proteïna tPFK-2 (PFKFB4) i es pugui detectar més immunofluorescència corresponent a tPFK-2 (PFKFB4) a partir de les espermatides en elongació.

Altres factors a tenir en compte que podrien explicar la localització de tPFK-2 (PFKFB4) i uPFK-2 (PFKFB3) en el complicat entramat cel·lular que forma el testicle són els factors que produeixen les cèl·lules de Sertoli. Aquests són summament importants per tal de completar amb èxit la progressió dels espermatogonis a espermatozoides, és a dir, per portar a terme els processos d'espermatogènesi i espermiogènesi. Segons Griswold i els seus col·laboradors, les glicoproteïnes que fabriquen i secreten les cèl·lules de Sertoli al medi adluminal es poden dividir en quatre categories: (a) aquelles que faciliten el transport d'ions i hormones, per exemple: la proteïna d'unió als andrògens (ABP, Androgen Binding Protein), que com el seu nom indica s'uneix als andrògens lliures gràcies a l'alta afinitat que té; (b) proteases i inhibidors de proteases, de gran importància a l'hora de remodelar l'epiteli seminífer durant l'espermiació; (c) components estructurals de la membrana basal, i (d) reguladores, aquí s'inclouen les hormones que participen en el feed-back negatiu que controla la secreció de testosterona i FSH (veure Taula 1A de la introducció) (Griswold, 1995; Griswold, 1998).

Les cèl·lules de Sertoli també sintetitzen i secreten al medi intratubular altres tipus de glicoproteïnes que poden funcionar com a factors de creixement i que es poden considerar que es comporten com a factors reguladors paracrins. Alguns d'ells resulten ser fruit de l'estimulació hormonal produïda sobre les cèl·lules de Sertoli per la testosterona. Així doncs, la testosterona en el testicle actuaria com un factor pro-supervivència: in vitro, si es depriva el sèrum en el medi de cultiu dels túbuls seminífers s'indueix l'apoptosi que pot revertir-se amb l'addició de testosterona al cultiu. De fet, la privació dels andrògens en els mamífers té conseqüències en la progressió dels espermatòcits en fase de preleptotè cap a paquitè, a més també té associat un descens en el nombre d'espermàtides (Selva et al., 2000). Però, el mecanisme exacte pel qual la testosterona actua fomentant la supervivència germinal es desconeix, ja que precisament aquestes no presenten receptors d'andrògens que es localitzen a les cèl·lules somàtiques del testicle. Com a exemple de factors pro-supervivència que resulten de l'estimulació hormonal estarien el lactat, diversos factors de creixement i algunes hormones (inhibina i MIS) (Griswold, 1998; Walker and Cheng, 2005). El conjunt dels factors produïts i secretats al compartiment adluminal per les cèl·lules de Sertoli formarien part del microambient que envolta a les cèl·lules germinals en proliferació i que les influiria.

A la Taula 4.2., es recull un llistat d'alguns dels senyals paracrins que poden regular el destí de les cèl·lules germinals

Nom	Símbol	Referència
<i>Interleukin-4</i>	IL-4	(Cooke et al., 1996)
<i>Stem Cell Factor</i>	SCF	(Allard et al., 1996)
<i>Fibroblast Growth Factor</i>	FGF	(Griswold, 1998)
<i>Insulin Growth Factor-I</i>	IGF-I	(Griswold, 1998)
<i>Epidermal Growth Factor</i>	EGF	(Griswold, 1998)
<i>Bone Morphogenetic Protein</i>	BMP	(Itman and Loveland, 2008)
<i>Desert Hedgehog</i>	Dhh	(Gnessi et al., 1997)
<i>Glial cell line-derived Neurotrophic Factor</i>	GDNF	(Meng et al., 2001)
<i>Platelet-derived Growth Factor</i>	PDGF	(Basciani et al., 2002)
<i>Transforming Growth Factor-beta</i>	TGF $\beta$	(Griswold, 1998)
Lactat	-	(Erkkila et al., 2002)

TAULA 4.2. Productes de les cèl·lules de Sertoli que poden actuar com a senyals paracrins reguladors del destí de les cèl·lules germinals.

Per tal de simular les condicions del medi on in vivo es desenvolupen les cèl·lules germinals, aquestes van ser tractades amb un medi de cultiu que provenia d'estimular les cèl·lules de Sertoli amb una concentració de  $10^{-9}$ M de testosterona, és a dir, que vàrem cultivar les cèl·lules germinals amb un medi condicionat amb testosterona (TCM). Sota aquest tractament, tant els enzims uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) com els gens que els codifiquen, *Pfkfb3* i *Pfkfb4*, respectivament, van comportar-se de forma diferent. Mentre *Pfkfb3* i la seva corresponent proteïna van disminuir quan les cèl·lules germinals van ser tractades amb el medi TCM, el gen *Pfkfb4* i la proteïna que codifica van incrementar llurs expressions. Els resultats que es presenten en el capítol tres d'aquesta memòria de tesi, suggereixen que en la regulació a les cèl·lules germinals tant de les expressions dels gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4*, com de les proteïnes per les que codifiquen, actuaria algun factor soluble produït per les cèl·lules de Sertoli sota l'estimulació hormonal de la testosterona. Sobre uPFK-2 (PFKFB3), en els espermatogonis només s'ha pogut veure un efecte de l'actuació a nivell de la proteïna, reduint-ne la seva expressió. Mentre que als espermatòcits regularia, en negatiu, tant els nivells de l'mRNA com els nivells proteics. Sobre la proteïna tPFK-2 (PFKFB4), en tots dos tipus cel·lulars, actuaria a nivell transcripcional i proteic per incrementar-ne l'expressió.

Hi ha poca informació sobre com els factors de creixement podrien actuar sobre les cèl·lules germinals per promoure'ls la supervivència. Pel que fa a les cèl·lules germinals primordials, s'ha vist que in vitro diversos factors, com per exemple: IL-4, FGF i BMP-4, promouen la seva supervivència. Per contra, el TFG- $\beta$  promou l'apoptosis dels gonòcits en un cultiu primari. Ara bé, la supervivència dels gonòcits és garantida si es fa un co-cultiu primari amb cèl·lules de Sertoli ja que aquestes

produeixen altres factors de creixement pro-supervivència que poden contrarestar l'acció del TGF- $\beta$ , per exemple: FGF, BMP-4 i IL-4 (Cooke et al., 1996; Dolci et al., 1991; Matsui et al., 1992). En els adults, són altres els factors de creixement els que asseguren la supervivència de les cèl·lules germinals. S'ha descrit que alguns membres de la família dels BMP, en concret BMP-8-A i BMP 8-P són els encarregats de proporcionar els senyals de supervivència als espermatòcits. Altres senyals paracrins són els factors Dhh, que és secretat per les cèl·lules de Sertoli i fomenta la supervivència germinal, i GDNF, que regula la renovació dels espermatogonis i la posterior diferenciació (Meng et al., 2001).

El lactat per si mateix ja pot considerar-se com un factor pro-supervivència, perquè incrementa la síntesi proteica i la concentració d'ATP tant en els espermatòcits com en les espermatides en cultiu (Erkkila et al., 2002; Jutte et al., 1981; Nakamura et al., 1981). Per aquests motius es podria pensar que el lactat present en els medis condicionats estigués afectant a l'expressió del gen *Pfkfb4*. Quan es van cultivar les cèl·lules germinals amb un medi condicionat basal (BCM, aquell que va estar en contacte amb les cèl·lules de Sertoli sense haver sigut suplementat amb testosterona) s'activava la transcripció del gen *Pfkfb4* ja que les respostes luciferases de les construccions *Pfkfb4*-1800 i *Pfkfb4*-2100 es van incrementar significativament respecte la situació basal. Llavors, es podria suposar que la transcripció del gen *Pfkfb4* es podria controlar pels nivells de lactat presents en el medi. Però, per acabar de demostrar la implicació del lactat en l'expressió de *Pfkfb4* s'hauria de cultivar les cèl·lules germinals amb concentracions creixents de lactat exogen per verificar una correlació entre l'increment en la quantitat de lactat i un increment en la transcripció del gen *Pfkfb4* en resposta al tractament.

Els efectes produïts pel medi condicionat TCM (aquell que va estar en contacte amb les cèl·lules de Sertoli i sí va ser suplementat amb la testosterona) sobre l'expressió tant de les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) com dels gens que les codifiquen: *Pfkfb3* i *Pfkfb4*, es podrien explicar per la presència d'algun factor soluble en el medi TCM resultat de l'estimulació hormonal de la testosterona sobre les cèl·lules de Sertoli. Aquest factor desconegut regularia positivament tant el gen *Pfkfb4* com la proteïna per la que codifica, tPFK-2. Igualment, el mateix factor o potser un altre, regularia negativament l'expressió del gen *Pfkfb3* i de la proteïna uPFK-2. El o els factors del medi TCM podrien interaccionar directament amb la seqüència promotora *Pfkfb4* i *Pfkfb3* o bé podrien activar vies de senyalització amb la finalitat de controlar la transcripció i la traducció de uPFK-2 (PFKFB3) (reduint-la) i de tPFK-2 (PFKFB4) (augmentant-la) en els models de cèl·lules germinals que s'han estudiat: espermatogonis i espermatòcits.

Un factor limitant en el creixement cel·lular als mamífers és la disponibilitat de nutrients per part de les cèl·lules proliferants. La deprivació dels nutrients comporta la reducció del metabolisme anabòlic, la caiguda del potencial de membrana mitocondrial, l'aturada del cicle cel·lular, atròfia i finalment la mort cel·lular (Edinger, 2007). Les hormones i els factors de creixement regulen l'accès de les cèl·lules a aquests nutrients modulant l'expressió del sistema de transport propi de cada nutrient (per exemple, del transportador de glucosa: GLUT-4) en la membrana cel·lular. Els factors de creixement reconeixen receptors del tipus tirosina cinasa en la membrana de les cèl·lules dianaes i s'hi uneixen, fet que comporta l'estimulació del receptor i, en conseqüència, l'activació de diferents vies de senyalització que actuen sobre la proliferació, la supervivència i la diferenciació cel·lular. Les vies de transducció de senyals per les que actuen són, principalment, la via de PI3K/Akt/mTOR i la de les MAPK (Mitogen-activated protein kinase (Edinger, 2007; Ghosh et al., 2005).

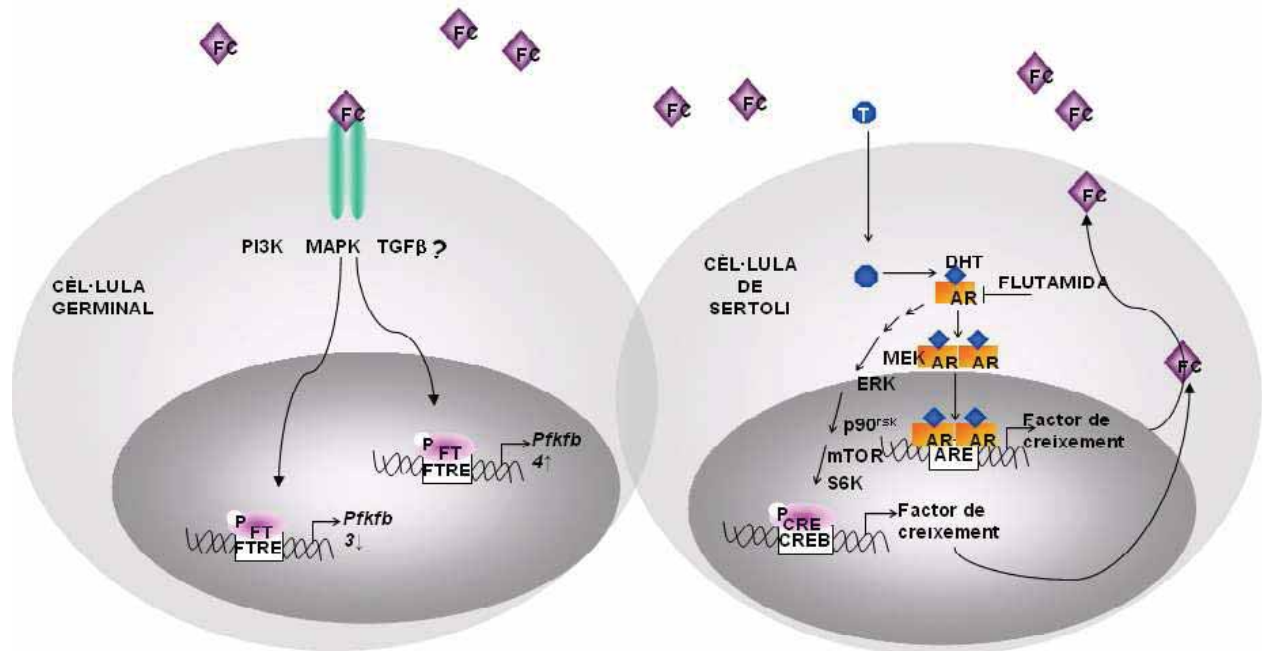
La via de PI3K/Akt/mTOR està àmpliament expressada en els sistemes cel·lulars que responen als factors de creixement, per exemple l'IGF (*insulin growth factor*). La unió del factor de creixement, o en el nostre cas del factor soluble que estaria en el medi TCM, al receptor activaria la proteïna PI3K (*Phosphoinositide 3-kinasa*) que activaria la cascada de fosforilacions, amb efectors com l'Akt (també anomenada PKB: proteïna cinasa B) i mTOR (*mammalian target of rapamicina*). L'activació de la via PI3K/Akt/mTOR en resposta als factors de creixement té una clara funció en pro de la supervivència i la proliferació, i augmenta moltes de les activitats metabòliques que suporten la biosíntesi cel·lular (DeBerardinis et al., 2008; Ghosh et al., 2005). No obstant, l'AKT pot fosforilar directament l'enzim PFK-2 i activar d'aquesta manera la glucòlisi (Hammerman et al., 2004).

La via de les MAPK també es troba activa en aquells sistemes cel·lulars que responen als factors de creixement, per exemple l'EGF (*epidermal growth factor*). La unió del factor de creixement, o en el nostre cas del factor soluble que estaria en el medi TCM, al receptor activaria la proteïna MEK (*mitogen-activated protein kinase*) que activaria la cascada de fosforilacions, amb efectors com ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) i mTOR (*mammalian target of rapamicina*). L'activació de la via de les MAPK en resposta als factors de creixement afavoreix la proliferació i la diferenciació cel·lular.

Per altra banda, hem de tenir en compte que part dels factors paracrins produïts per les cèl·lules de Sertoli pertanyen a la família del TGF- $\beta$  (com pot ser el mateix TGF o BMP). Es va estudiar en detall la seqüència d'aquests 800 nucleòtids mitjançant programes informàtics (Transfac, ECR Browser) per tal de trobar-hi elements de resposta a algun dels seus efectors transcripcionals. En aquesta regió del promotor del gen *Pfkb4* es van localitzar possibles seqüències d'unió a proteïnes

Smads (5'-CTGT-3' i la seva complementària 5'-AGAC-3') (Massagué et al., 2006) que es troben conservades tant a ratolí com a gos.

Qualsevol d'aquestes vies de senyalització, o la seva combinació, podrien mitjançar els efectes sobre les cèl·lules germinals de l'estimulació hormonal de les cèl·lules de Sertoli i ser les responsables de regular l'expressió d'uPFK-2 (PFKFB3) i de tPFK-2 (PFKFB4) en el transcurs de l'espermatogènesi.



**FIGURA 4. 5.** Esquema de les possibles relacions que s'estableixen entre les cèl·lules de Sertoli i les cèl·lules germinals en resposta a l'estimulació hormonal per part de la testosterona. L'hormona testosterona entra a la cèl·lula de Sertoli i bé per acció directa actuant com un factor de transcripció o bé per l'activació de vies de senyals estimula la síntesi d'un factor de creixement que es alliberat al medi i entra a les cèl·lules germinals gràcies a un receptor de membrana específic. Aquest factor de creixement en la cèl·lula germinal activarà vies de transducció de senyals (PI3K, MAPK, o TGFβ) per tal que algun o alguns factors de transcripció associats a aquella o aquelles vies actuïn regulant la transcripció dels gens *Pfkfb4* (de forma positiva) i *Pfkfb3* (de forma negativa).





---

## **5.- CONCLUSIONS**

---

*Presiento que tras la noche,  
vendrá la noche más larga.  
(Al Alba. Luis Eduardo Aute)*



1. S'ha generat un anticòs policlonal enfront la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) humana, de rata i de ratolí. Aquest anticòs reconeix específicament la isoforma amb una bona sensibilitat i és capaç d'immunoprecipitar tant la proteïna sobreexpressada en cèl·lules eucariotes com l'expressada de manera endògena en dues línies cel·lulars humanes derivades de tumors de pròstata (LNCaP i PC-3).
2. Les proteïnes uPFK-2 (PFKFB3) i tPFK-2 (PFKFB4) en el testicle de rata s'expressen durant els últims dies del desenvolupament embrionari (E,18, E19, E20 i E21), així com durant el desenvolupament postnatal. L'expressió de la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) disminueix al voltant del dia 30 postpart. Es detecten dues bandes de la proteïna tPFK-2 (PFKFB4), una de 50 i una altra de 55 kDa. La de 50 kDa no varia en el temps, mentre que la de 55 kDa s'incrementa progressivament a partir dels 10 dies postpart.
3. A nivell d'expressió gènica, *Pfkfb3* i *Pfkfb4* es troben expressats en el testicle adult, essent la quantitat relativa de *Pfkfb4* majoritària. Quan s'analitza l'expressió al llarg del desenvolupament del testicle, el gen *Pfkfb4* té el màxim d'expressió en l'animal adult (dia 90 postpart), mentre que es manté pràcticament constant i sense variacions significatives a la resta de períodes analitzats. El gen *Pfkfb3* presenta lleugers pics de mRNA els dies E21, 6 i 18 postpart, i un màxim a dia 30 postpart.
4. A partir de l'anàlisi de les poblacions cel·lulars aïllades que constitueixen el testicle s'ha localitzat la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) tant en les cèl·lules somàtiques (Sertoli, Leydig i peritubulars) com en les germinals. La proteïna tPFK-2 (PFKFB4) només s'ha localitzat a les cèl·lules germinals, en especial a les postmeiòtiques: les espermatides rodones i les espermatides en elongació. A partir d'espermatozoides aïllats de l'epidídim, a diferents edats de maduració (30 i 90 dies postpart), s'ha localitzat la proteïna uPFK-2 (PFKFB3) en aquells espermatozoides més immadurs (30 dies) i la proteïna tPFK-2 (PFKFB4) en els més madurs (90 dies). Tenint en compte aquests resultats, es pot concloure que durant els processos d'espermatogènesi i espermiogènesi es produiria una alternança d'isoenzims de la PFK-2. L'isoenzim ubic, uPFK-2 (PFKFB3), seria necessari durant les fases proliferatives, però un cop s'han format els espermatozoides madurs perdria importància. En canvi, l'isoenzim de testicle, tPFK-2 (PFKFB4), seria un enzim característic d'expressió germinal trobant-se en les cèl·lules espermatogèniques i en els espermatozoides.
5. S'ha identificat l'inici de transcripció del gen *Pfkfb4* en la posició -25 del codó ATG i es correspon amb un residu citosina. A més a més, s'ha demostrat que els primers -141 nucleòtids del promotor són els responsables de la transcripció basal d'aquest gen.

6. S'ha clonat i caracteritzat la regió 5' no transcrita del gen *Pfkfb4* (fins, aproximadament, a -3500 nucleòtids), localitzant possibles llocs d'unió per a factors de transcripció específics, com són els elements de resposta a hipòxia (HRE) i elements de resposta als andrògens i als estrògens (ARE i ERE, respectivament), i seqüències consens pels factors Sp1 i c-Myc.
7. S'ha demostrat que dels putatius elements HRE localitzats a la seqüència del promotor *Pfkfb4*, almenys el de la posició -404 seria necessari per la resposta del gen *Pfkfb4* a la hipòxia en les cèl·lules GC-1 spg. En canvi, només la seva presència no seria suficient per explicar la resposta a la hipòxia en les cèl·lules GC-2 spd (ts), on es farien necessàries altres de les possibles caixes HRE que hi ha en el promotor del gen *Pfkfb4*. Aquesta seria una resposta dependent de la presència d'HIF1 actiu en la cèl·lula ja que la inducció d'hipòxia desapareix en cèl·lules defectives en l'expressió del factor HIF 1 $\alpha$  (mEF/HIF1(-/-)).
8. El factor de transcripció Sp1 activa la transcripció basal del gen *Pfkfb4*. En situacions d'hipòxia, Sp1 potencia un augment en la resposta del promotor, essent més significatiu l'efecte en la construcció *Pfkfb4*/-428, suggerint un efecte additu d'ambdós estímuls.
9. La presència del factor de transcripció c-Myc inhibeix la transcripció del promotor *Pfkfb4*, provocant una reducció del 90 % en la construcció de major grandària: *Pfkfb4*/-2100. Els possibles elements de resposta a c-Myc presents en el promotor a les posicions -409, -1229 i -2023 podrien ser els candidats responsables de controlar aquesta inhibició. A més, la presència de c-Myc contribuiria a frenar l'efecte d'HIF 1 sobre la transcripció del gen *Pfkfb4* ja que, en aquestes condicions, no s'arriben a obtenir els valors d'inducció aconseguits amb la hipòxia sola.
10. Tenint en compte l'efecte negatiu de c-Myc sobre el promotor del gen *Pfkfb4* humà, la sobreexpressió de Sp1, conjuntament amb la hipòxia podrien contrarestar aquesta inhibició i cooperar conjuntament per aconseguir induccions encara majors.
11. En analitzar l'efecte hormonal sobre l'expressió gènica de *Pfkfb4* s'ha trobat que: l'androgen 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona no té cap efecte sobre l'activitat transcripcional del gen *Pfkfb4*. En canvi, la presència de l'estrogen 17- $\beta$ -estradiol provoca una reducció de més del 50% en l'activitat del promotor *Pfkfb4*. El fet que siguin les construccions del promotor *Pfkfb4*/-1077 i *Pfkfb4*/-1800 les que donen aquesta resposta, faria pensar que alguna de les seqüències ERE localitzades en aquesta regió en seria responsable.
12. Tant en el model d'espermatogoni (GC-1spg) com en el model d'espermatòcit (GC-2 spd (ts)), l'expressió de l'enzim tPFK-2 (PFKFB4) s'incrementa més del doble per efecte del tractament amb

medi condicionat provinent de cèl·lules de Sertoli tractades amb testosterona (medi TCM). Pel que fa a l'expressió de l'enzim uPFK-2 (PFKFB3), aquesta es redueix un 50% aproximadament per efecte del mateix tractament en els dos models germinals.

13. Tant en el model d'espermatoconi (GC-1spg) com en el model d'espermatoçit (GC-2 spd (ts)), la transcripció del gen *Pfkfb4* s'incrementa més del doble en els dos models cel·lulars per efecte del tractament amb medi condicionat provinent de cèl·lules de Sertoli tractades amb testosterona (medi TCM). Aquesta resposta està limitada a la regió promotora localitzada entre les posicions -1077 i els -1800. Pel que fa a l'expressió del gen *Pfkfb3*, mentre aquesta no sembla s'afectar-se de manera significativa pel tractament amb el medi condicionat amb testosterona (TCM) a les cèl·lules GC-1 spg, a les cèl·lules GC-2 spd (ts) es redueix aproximadament un 50%.
14. Els resultats obtinguts en cèl·lules germinals com a resposta al tractament amb el medi condicionat amb testosterona (medi TCM), tant a nivell de proteïna com d'expressió gènica de *Pfkfb3* i *Pfkfb4*, suggeriria que l'alliberament d'algun factor al medi per part de les cèl·lules de Sertoli faria de transmissor de la senyal hormonal d'aquestes sobre les cèl·lules germinals regulant els gens *Pfkfb3* i *Pfkfb4*.



---

## **6.- MATERIAL i MÈTODES**

---

*Mide lo que se pueda medir y lo que no hazlo medible  
(Galileo Galilei)*





---

# Tècniques de Biologia Molecular

---

## BACTERIS

---

### Creixement líquid / sòlid

#### Material:

Medi de cultiu LB:

LB líquid: NaCl 10 g/L, Triptona o peptona 10 g/L, extracte de llevat 5 g/L, pH: 7. S'autoclava

LB-Agar, a més s'afegeix agar 15 g/L i també s'autoclava. Quan es refreda es plaqueja en plaques de Petri

Antibiòtic de selecció: ampicil·lina o kanamicina (50 mg/ml). S'afegeix un cop el medi s'ha atemperat

#### Protocol:

- A. En el cas dels cultius líquids, es fan créixer les cèl·lules en agitació amb medi LB més l'antibiòtic de selecció a 37°C durant tota la nit. Per tal d'assegurar una bona oxigenació del cultiu, el recipient no es pot omplir més de dues terceres parts.
- B. En el cas dels cultius sòlids, es fan servir plaques de LB-agar amb l'antibiòtic de selecció. Les plaques es deixen cap per avall a 37°C tota la nit.

### Obtenció de cèl·lules competents

#### Material:

Medi de cultiu LB líquid: NaCl 10 g/L, Triptona o peptona 10 g/L, extracte de llevat 5 g/L, pH: 7. Autoclavat 50 mM CaCl<sub>2</sub> (dihidratat). Es prepara el dia anterior, s'autoclava i es guarda a 4°C

Glicerol autoclavat

#### Protocol:

1. Créixer un minicultiu a partir d'un stock de glicerol d'Escherichia coli susceptibles de ser competents en 15 ml de LB líquid sense antibiòtic en agitació a 37°C durant tota la nit.
2. Passar el minicultiu a un erlenmeyer d' 1 litre de capacitat amb uns 300 ml de LB líquid sense antibiòtics.
3. Controlar el creixement bacterià llegint l'absorbància a 590-600 nm, cada 30 minuts, fins que s'obtingui una lectura de 0.5, indicativa d'un creixement exponencial.
4. Passar els 300 ml a falcons de 50 ml.
5. Centrifugar a 1500 rpm a 4°C durant 10 minuts, descartar el sobrenedant. A partir d'ara és important treballar a 4°C amb un material pre-refredat.
6. Resuspendre els pèl·lets bacterians en 25 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM i deixar en gel durant 30 minuts.
7. Centrifugar a 1500 rpm a 4°C durant 10 minuts, descartar el sobrenedant.
8. Resuspendre els pèl·lets bacterians en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM.
9. Centrifugar a 1500 rpm a 4°C durant 10 minuts, descartar el sobrenedant.

10. Resuspendre els pèl·lets bacterians en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM.
11. Ajuntar tots els vials en un, s'afegeix glicerol fins a una concentració final del 20% i es fan alíquotes, d'entre 200-500 µls, i es congelen immediatament en nitrogen líquid. Es guarden a -80°C.

### **Transformació de cèl·lules competents per xoc tèrmic**

#### Material:

Cèl·lules competents.

Medi de cultiu LB líquid: NaCl 10 g/L, Triptona o peptona 10 g/L, extracte de llevat 5 g/L, pH: 7. Autoclavat

Plaques de LB-agar amb l'antibiòtic de selecció.

#### Protocol:

1. Descongelar un vial de cèl·lules competents en gel.
2. Afegir 5 µl d'una lligació en 50 µl de cèl·lules competents i agitar suaument per inversió.
3. Deixar en gel de 5 a 30 minuts.
4. Realitzar el xoc tèrmic (triar entre (a) i (b)):
  - a) 30 segons a 42°C i 2 minuts en gel
  - b) 5 minuts a 37°C i 1 minut 30 segons en gel
5. Afegir 800 µl de medi LB líquid sense antibiòtics a temperatura ambient.
6. Posar el tub, inclinat, en un agitador a 200 rpm durant 1 hora a 37°C
7. Centrifugar els vials a 3000 rpm durant 3 minuts a 37°C.
8. Eliminar volum de sobrenedant fins que només quedin 50 µl de medi, amb el que es resuspèn el pèl·let bacterià.
9. Plaquejar les bacteries en condicions d'esterilitat en les plaques de LB selectives, prèviament pre-escalfades a 37°C.
10. Deixar les plaques a l'estufa, de cap per avall, a 37°C durant tota la nit.

### **Preparació d'estocs de glicerol**

#### Material:

Cultiu bacterià transformat amb el plasmidi d'interès

Glicerol 80% (v/v) estèril

Medi LB líquid

#### Protocol:

1. Inocular els bacteris en medi LB amb l'antibiòtic de selecció adequat.
2. Incubar a 37°C, durant tota la nit en agitació.
3. Barrejar 810 µl de cultiu bacterià amb 190 µl de glicerol 80% (el percentatge final és del 15%). Agitar per inversió i guardar a -80°C.

---

## DNA

---

### Purificació de DNA plasmídic

#### Material:

Cultiu bacterià transformat amb el plasmidi d'interès.

kit Wizard®plus minipreps (Promega).

GenElute™ Endotoxin-free Maxiprep Plasmid purification kit (SIGMA).

#### Protocol:

A. Per a la purificació de DNA plasmídic a petita escala o Miniprep:

Partir de 5ml de cultiu bacterià líquid, seguir el protocol del kit de miniprep.

S'acostuma a utilitzar com a pas intermediari per tal de comprovar que es tracta del plasmidi d'interès (un cop obtingut el DNA plasmídic, es realitzen digestions amb enzims de restricció per confirmar que es tracta del nostre plasmidi).

B. Per tal d'obtenir quantitats elevades de DNA o Maxiprep:

Partir d'un cultiu bacterià líquid de 130 ml, seguir el protocol del kit de la maxiprep.

Un cop obtinguda una gran quantitat de DNA, es quantifica llegint l'absorbència a  $\lambda$  260 nm a l'espectrofotòmetre, preparant una dilució 1:50. La ratio d'absorbència 260/280 ha de ser aproximadament 1.80. Es calcula la concentració de DNA aplicant la fórmula:

$$[ \text{DNA} ] \text{ (mg/ml)} = \text{Abs } 260 \times 50 / \mu\text{l DNA plasmídic.}$$

### Purificació de fragments de DNA amb Fenol-Cloroform

#### Material:

FENOL:CLOROFORM:ISOAMILALCOHOL (25:24:1) (Ph/Chisam)

Cloroform

#### Protocol:

1. Afegir un volum de Fenol/Cloroform (Ph/Chl) igual al volum existent de mostra
2. Barrejar i centrifugar a velocitat màxima durant 10 minuts
3. Recollir el sobrenedant (fase aquosa)
4. Tornar a afegir un volum de Ph/Chisam igual a l'existent de mostra
5. Barrejar i centrifugar a velocitat màxima durant 10 minuts
6. Recollir el sobrenedant (fase aquosa)
7. Afegir dos volums de Cloroform igual a l'existent de mostra
8. Barrejar i centrifugar a velocitat màxima durant 10 minuts
9. Recollir el sobrenedant (fase aquosa)

### Precipitació de fragments de DNA amb rentats amb etanol

#### Material:

NaOAc 3M

ETOH 100% fred

ETOH 75% fred

Aigua mQ autoclavada

Protocol:

1. Afegir 0.1 volum de NaOAc 3M al volum de mostra
2. Afegir 2.5 volums de ETOH 100% fred
3. Deixar, com a mínim, 30 minuts a  $-80^{\circ}\text{C}$
4. Centrifugar a velocitat màxima durant 15 minuts,  $4^{\circ}\text{C}$
5. Aspirar el sobrenedant amb la pipeta, amb cura de no aspirar també el pèl·let
6. Afegir 2.5volums de ETOH 75% fred per rentar el pèl·let
7. Centrifugar a velocitat màxima durant 15 minuts,  $4^{\circ}\text{C}$
8. Aspirar el sobrenedant amb la pipeta, amb compte de no aspirar també el pèl·let (és recomanable d'aspirar les gotes d'etanol de les parets amb el buit)
9. Deixar assecar a la campana de buit
10. Resuspendre el pèl·let amb aigua mQ autoclavada

## **Electroforesi de DNA en un gel d'agarosa**

Material:

Agarosa

TAE, 1X

Buffer de DNA 6X (60% Glicerol, 60 mM EDTA)

Bromur d'etidi (BrEt) 10 mg/ml

Cubeta i font d'electroforesi

Marcador de pes molècular *GeneRuler™ DNA ladder Mix*,  $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . (Fermentas)

Protocol:

1. Dissoldre l'agarosa en TAE 1X aplicant calor (amb un microones)
2. Mentre es refreda l'agarosa, es prepara el suport amb tires adhesives per fer-lo estanc i l'agarosa pugui solidificar
3. Possar una gota BrEt ( $0,5\text{-}1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en l'agarosa dissolta i refredada, aplicar-la en el suport, i col·locar la pinta per fer els pouets
4. Un cop solidificada, es retiren les tires adhesives, i es fica el gel a la cubeta d'electroforesi
5. Cobrir totalment amb TAE1X
6. Preparar les mostres afegint el buffer de DNA (dilució 1:6)
7. Aplicar les mostres de DNA i el marcador de pes molecular en els pouets del gel
8. Connectar la font a la cubeta i aplicar la corrent elèctrica, 90V
9. El resultat de l'electroforesi es visualitza en un transil·luminador que porta associat una càmera fotogràfica

**NOTA:** La concentració final d'agarosa (0,75-2%) depèn del tamany del fragment que volem visualitzar, quan més petit sigui el fragment, major haurà d'ésser el percentatge del gel. Normalment, els gels acostumen a ser de l'1%.

Solucions:

<b>TAE 50X</b>
Tris 40 mM (200 g/L)
Àcid acètic 20 mM (57.1 ml acètic glacial)
EDTA 1mM (100 ml EDTA 0.5 M)
<b>S'autoclava</b>

### **Extracció de DNA de gels d'agarosa**

Material:

QIAquick gel Extraction kit (50) (Qiagen)

Fulla bisturí

Protocol:

Es realitza una electroforesis del DNA a un gel d'agarosa, el seu percentatge dependrà de la mida de les bandes de DNA que es vol obtenir. Un cop acabada l'electroforesi, es retalla la banda d'interès al transiluminador i es purifica seguint el protocol del kit escollit.

### **Amplificació de fragments de DNA per PCR**

Material:

Taq polimerasa (5U/ $\mu$ l)

Tampó per PCR (10x)

Barreja de nucleòtids trifosfat (dNTP) per PCR a 10 mM cada un

Aigua mQ estèril

Oligonucleòtids específics a 20 $\mu$ M (20 pmol/ $\mu$ l)

Termociclador Perkin Elmer

Protocol:

1. Barrejar en tubs endopors estèrils de 250  $\mu$ l els següents components:

5  $\mu$ l de Tampó de PCR 10X  
 1  $\mu$ l de dNTPs (200 mM final de cada un)  
 1  $\mu$ l de cada oligo  
 1  $\mu$ l de Taq polimerasa  
 $\mu$ l de DNA o aigua com a control negatiu  
 $\mu$ l d'aigua mQ estèril  
 50  $\mu$ l de volum final

2. Programar el termociclador:

Desnaturalització: 2 minuts a 95°C

30-35 cicles: Desnaturalització: 30-45 segons a 95°C

Anellament: 30-45 segons a la temperatura òptima dels oligos triats

Elongació: 1 min/kb a elongar a 72°C

Elongació final: 7-10 minuts a 72°C

Mantenir a 4°C

3. Analitzar l'amplificació en un gel d'agarosa i comprovar la mida i el número de les bandes obtingudes

## **Seqüenciació automàtica de DNA**

### Material:

ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin Elmer

Columnes de sefarosa G-50, Amersham Pharmacia

Speed-vac

### Protocol:

La reacció de seqüenciació es porta a terme seguint el protocol del kit ABI PRISM. Els oligonucleòtids marcats s'eliminen amb columnes de sefarosa G-50 i finalment s'assequen al speed-vac, aproximadament durant uns vint minuts. Un cop assecada la mostra es porta a seqüenciar als serveis científicotècnics de la Universitat de Barcelona

## **Producció d'extrems roms**

### Material:

T4 DNA Polimerasa (FERMENTAS, # EP0061, 300u, 5u/μl)

L'enzim T4 DNA polimerasa converteix els extrems 5' i 3' protuberants a extrems roms gràcies a la capacitat de síntesi de DNA 5'→3'. A més, també té activitat exonucleasa 3' → 5', però no 5'→3' exonucleasa.

Una unitat d'enzim catalitza la incorporació de 10 nanomols de deoxinucleòtids.

### Protocol:

Barreja de reacció:                   4μl de tampó de reacció 5X  
  1μg de DNA digerit  
  1μl de dNTP 2mM (ha d'estar a 0.1 mM de concentració final)  
  1u de T4 DNA polimerasa  
  fins a 20 μl d'aigua mQ autoclavada

1. Incubar la barreja a 11°C durant 20 minuts
2. Aturar la reacció escalfant a 75°C durant 10 minuts.

En aquest punt es pot congelar a -20°C.

### NOTA:

Un excés de T4 DNA polimerasa o bé un temps d'incubació massa llarg, resulta en un excés de DNA amb extrems tallats degut a l'activitat exonucleasa 3'→5' de l'enzim.

## Defosforilació d'extrems 5' i 3' de DNA

### Material:

CIAP, *Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, (FERMENTAS, # EF0341, 200u, 1u/l)

L'enzim CIAP catalitza la hidròlisi de residus 5'-fosfats de DNA, RNA i ribo- i deoxiribonucleòsids trifosfats.

A més, té activitat exonucleasa 3'->5' però no activitat 5'->3' exonucleasa.

### Protocol:

Preparar la següent barreja de reacció:

	10-40 µl solució de DNA d'1 a 20 pmols de DNA dissolts en aigua mQ
	5 µl de tampó de reacció 10x
	µl d'aigua mQ autoclavada
	1u/µl de CIAP
Volum final:	50 µl

Incubar a 37°C durant 30 minuts

Aturar la reacció escalfant a 85°C durant 15 minuts o extreure el DNA amb fenol/cloroform i precipitar amb etanol. En aquest punt es pot congelar a -20°C

### NOTA:

El tractament amb CIAP pot fer-se directament després de digerir el DNA amb els enzims de restricció, sense purificar prèviament. Es recomana usar 0.05 unitats de CIAP per a defosforilar 1 pmol d'extrem de DNA, s'ha de posar CIAP en excés, 2x o 3x.

### CÀLCUL dels pmols d'extrems:

\* Per a una molècula circular (plàsmid):

$$\text{pmol extrem} / \mu\text{g DNA} = (2N \cdot 10^6) / (L \cdot 649)$$

\* Per a una molècula lineal (insert):

$$\text{pmol extrem} / \mu\text{g DNA} = (2(N+1) \cdot 10^6) / (L \cdot 649)$$

N: nombre de dianes de restricció/fragment i L: longitud de la molècula en pb

## Clonatge de fragments de DNA obtinguts per PCR en el vector TOPO-TA

### Material:

Bany a 42°C

Plaques de LB selectives, atemperar escalfant a 37°C durant 30'

X-Gal (40mg/ml), afegir 40 µl a cada placa de LB selectiva

(El X-Gal es dissolt en dimetilformamida (DMF))

Antibiòtics: 50 µg de Kanamicina /ml o 100 µg d'Ampicil·lina /ml

TOPO® PCR Cloning (Invitrogen), conté el vector TOPO®-TA, els tampons necessaris per fer la lligació, el medi SOC per créixer els bacteris (es guarda a -80°C i s'atempera abans d'usar) i les cèl·lules competents.

### Protocol:

Barrejar en un vial els volums dels següents components:

Lligació dels Productes de PCR al VECTOR TOPO®-TA		CONTROLS DE LLIGACIÓ	
producte de PCR	0.5 – 4 µl	-	1µl
tampó de lligació	1µl	1µl	1µl
aigua mQ autoclavada	fins 5µl	4µl	3 µl
vector TOPO-TA	1µl	1µl	-
Volum final:	6 µl	6 µl	6 µl

Agitar i incubar de 30 segons a 30 minuts a temperatura ambient

Aturar la reacció en gel, en aquest punt es pot guardar a -20°C tota la nit

### TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS AMB EL RESULTAT DE LA LLIGACIÓ

1. Descongelar un vial de cèl·lules competents en gel
2. Afegir 2µl de la lligació al vial de les cèl·lules competents i agitar suaument
3. Deixar en gel de 5 a 30 minuts
4. Realitzar el xoc tèrmic, 30 segons a 42°C i 2 minuts a 4°C (gel)
5. Afegir 250 µl de medi SOC a temperatura ambient
6. Col·locar el tub amb certa inclinació en un agitador. Agitar a 200 rpm durant 1 hora a 37°C
7. Centrifugar els vials a 3000 rpm durant 3 minuts a 37°C
8. Eliminar tant volum de sobrenedant fins que només quedin 50 µl de medi, amb el que es resuspen el pèl·let bacterià
9. Plaquejar els bacteris en condicions d'esterilitat en les plaques de LB selectives, prèviament preescalfades a 37°C i suplementades amb X-Gal.
10. Deixar les plaques a l'estufa tombades, a 37°C tota la nit

### ANÀLISI DELS CLONS POSITIUS

De totes les colònies crescudes a les plaques selectives, s'ha de poder diferenciar dos tipus; colònies blanques i blaves. En aquest cas interessen les blanques (que són les positives per la lligació, perquè en produir-se, el fragment de PCR ha disruptat la pauta de lectura del gen de la Galactosidasa i, per tant, els bacteris que han incorporat la lligació no poden metabolitzar el substrat X-Gal i donen colònies blanques).

#### Material:

Falcons de 15 ml

Medi LB líquid suplementat amb l'antibiòtic corresponent

(5 ml LB + 5 µl de Ampicil·lina / 5 ml LB + 2.5 µl de Kanamicina)

#### Protocol:

1. Afegir 5 ml de medi líquid LB a un falcon de 15 ml.
2. Picar una colònia, prèviament seleccionada i numerada, amb una punta estèril i deixar-la al falcon.
3. Possar el tub horitzontalment, o amb una certa inclinació, en un agitador. Agitar a 200 rpm a 37°C tota la nit.
4. Obtenir el DNA plasmídic a partir dels minicultius de les colònies seleccionades.



5. Analitzar el DNA plasmídic mitjançant una sèrie de digestions que permetin separar el vector TOPO-TA (3,9 kb) i el fragment de DNA.

### Digestió de plasmidis

Les digestions es preparen tenint en compte el tampó més adient per/l's enzim/s que es van a utilitzar. La temperatura d'incubació també dependrà de/l's enzim/s. El volum afegit d'enzim no pot ésser superior al 10% del volum final de digestió, degut al contingut de glicerol. Per calcular el temps d'incubació s'ha de tenir en compte que una unitat d'enzim talla 1 µg de DNA per hora a la temperatura recomanada pel fabricant.

Exemple del que s'ha d'afegir a un Eppendorf estèril per realitzar una digestió:

12 µl d'aigua milliQ estèril.  
5 µl de DNA (1 µg/µl).  
2 µl del tampó corresponent.  
1 µl d'enzim

Es comprova el resultat de la lligació mitjançant un gel d'aragosa. Es recomana carregar només la meitat del volum digerit (en aquest cas, 10 µls de la digestió).

### Lligació de fragments de DNA en el vector d'expressió pGL2Basic

Per fer les lligacions s'utilitzen 50 ng de plàsmid.

La quantitat de ng de l'insert es dedueix amb la següent fórmula:  $ng_{insert} = (ng_{vector} \times pb_{insert}) / pb_{vector}$

En la lligació les relacions insert: vector que més utilitzades són de 3:1 i 2:1.

Cal tenir en compte que al fer la lligació es fan servir 2 tubs, el 3:1 i el 0:1, aquest últim no conté insert i és el control de la lligació. Un cop transformats i sembrats els bacteris hauria d'haver-hi més colònies a la placa 3:1 que a la 0:1. Al fer les lligacions s'han de realitzar els corresponents controls negatius. Ha d'haver un vial sense insert i un altre sense vector.

#### Material:

Lligasa T4.

Buffer 10X.

#### Protocol:

Afegir a cada tub el següent per a un volum final de 20 µl:

	0:1	3:0	3:1
Insert	-	µl calculats	µl calculats
Vector	µl calculats	-	µl calculats
Buffer 10X	2 µl	2 µl	2 µl
Lligasa T4	1 µl	1 µl	1 µl
Aigua milliQ estèril	Fins a 20 µl	Fins a 20 µl	Fins a 20 µl

Els tubs es deixen tota la nit a 16 °C.

## RNA

---

### Obtenció d'RNA amb Ultraspec

Material:

Ultraspec™ RNA, *total RNA isolation reagen* (BIOTEX, Laboratorios, Inc)

Politró

Cloroform

Isopropanol

Aigua DEPC estèril

Centrífuga refrigerant

Protocol:

Primerament s'ha d'atemperar l'Ultraspec en un bany a 37°C durant 15 minuts

1. Homogenitzar els teixits, amb el Politró, uns 100 mg de teixit amb 1 ml de Ultraspec
2. Deixar 5 minuts a 4°C
3. Afegir 200 µl de Cloroform / ml d'Ultraspec afegit
4. Agitar, per inversió, durant 15 segons i deixar en gel (4°C) durant 5 minuts
5. Centrifugar 10000 g, 4°C, durant 20 minuts. En aquest punt és important no incrementar més la velocitat perquè els endorns es trenquen i es perden les mostres. Com a resultat de la centrifugació, s'obtenen dues fases; la inferior conté el DNA i les proteïnes, i la superior (líquida) l'RNA
6. Passar la fase aquosa a un nou endorf correctament rotulat
7. Afegir el mateix volum d'isopropanol que el volum de mostra recollit
8. Deixar 10 minuts en gel. En aquest punt es pot congelar (mínim 30 minuts a -80°C)
9. Centrifugar a 12000 g, 4°C, durant 20 minuts
10. Treure el sobrenedant
11. Rentar amb etanol 75% fred, 1ml d'etanol / 1ml d'Ultraspec afegit
12. Vortex
13. Repetir dos cops els passos 11 i 12
14. Centrifugar a 12000 g, 4°C, durant 10 minuts
15. Eliminar el sobrenedant, treure les gotes d'etanol de les parets del tub amb el buit
16. Assecat el pèl·let amb una campana extractora
17. Dissoldre el pèl·let en 200 µl d'aigua DEPC, vortexar 1 minut i deixar O/N a 4°C
18. Resuspendre bé el pèl·let
19. Centrifugar per eliminar possibles traces

Ara es pot quantificar i fer un gel de MOPS per veure la integritat de l'RNA purificat. Guardar a -80°C.

NOTA: Tot el procés es fa en gel, amb guants i utilitzant material estèril. Els dissolvents orgànics com l'ultraspect i el cloroform s'han d'afegir en una campana d'extracció.

Per tal d'optimitzar el procés, l'RNA de les mostres de testicle en desenvolupament es van obtenir mitjançant el kit comercial RNeasy® Minikit (50) (QIAGEN) seguint les instruccions del fabricant

## Electroforesi d'RNA en un gel de MOPS

### Material:

Agarosa

MOPS 10X

Aigua destil·lada i aigua DEPC

Formaldehid

Mostres de RNA

Tampó de RNA amb BrEt

Tampó de càrrega, LB 6X (60% Glicerol, 60 mM EDTA)

### Protocol:

#### 1. Fer un gel d'agarosa a l'1% en MOPS 1X

Per 50 ml de gel: 0.5 gr agarosa

36 ml H<sub>2</sub>O destil·lada

Calentar per disoldre l'agarosa i deixar atemperar

Afegir: 5 ml de MOPS 10X

9 ml formaldehid a 37°C

#### 2. Preparar les mostres: 2 µl RNA teixit

1,6 µl buffer de RNA amb BrEt

1,6 µl de LB 6X

4,8 µl H<sub>2</sub>O DEPC

Volum final: 10 µl

Escalfar a 65°C durant 10 minuts ( per eliminar les estructures secundàries)

Deixar en gel durant 2 minuts

#### 3. Carregar el gel de MOPS

MOPS 10X 500 mls	Tampó de Mostres (RNA BrEt)
0.2 M MOPS 20.9 g	129 µl MOPS 10X
50 mM Acetat Na 1.045 g	226 µl Formaldehid
5 mM EDTA 10 ml de 0.5 M EDTA	645 µl Formamida
Ajustar el pH: 7.4 i autoclavar	9 µl Bromur d'etidi
	H <sub>2</sub> O mQ fins 1.29 ml

## Obtenció de cDNA

### Material:

Kit obtenció de cDNA *High capacity cDNA archive kit* (Ambion)

Aigua DEPC autoclavada

### Protocol:

Barrejar a parts iguals (1vol: 1vol)

2X Mastermix (Tampó RT 2X, dNTPmix 25X, Random primers 10X, Multiscribe RT (50u/μl), RNA-se free H2O)

Mostra de RNA

Incubar en un bany o en un termociclador: 10 minuts, 25°C  
2 hores, 37°C  
4°C, O/N o -80°C si es deixa més temps, fer alíquotes

### **PCR Quantitativa a temps real (RT-PCR)**

La tècnica de la PCR quantitativa a temps real permet quantificar el contingut d'un determinat RNA en una mostra.

#### Material:

Oligonucleòtids per a RT-PCR predissenyats i optimitzats per la casa comercial, també es coneixen com a *Assay-on-Demand* (Applied Biosystems).

Oligonucleòtid	Referència
<i>Pfkfb4</i>	Rn_00570987_m1
<i>Pfkfb3</i>	Rn_00589179_m1
<i>Actina</i>	Rn_0067869_m1

Aigua mQ autoclavada

Màquina de PCR 7700 *sequence detection system* (Applied Biosystems)

*Taqman Universal PCR Master Mix 2x* (Applied Biosystems)

#### Protocol:

A partir de 5 ng de RNA retrotranscrit, s'amplificaran els gens d'elecció; *Pfkfb4* i *Pfkfb3*, i el control per a normalitzar; *Actina*.

Preparar la barreja de reacció; per pou: 12.5 μl de *Taqman Universal PCR Master Mix 2x* i 1.25 μl dels oligonucleòtids

Preparar la mostra; per pou: cDNA motlle, aigua mQ (volum total 11.25 μl)

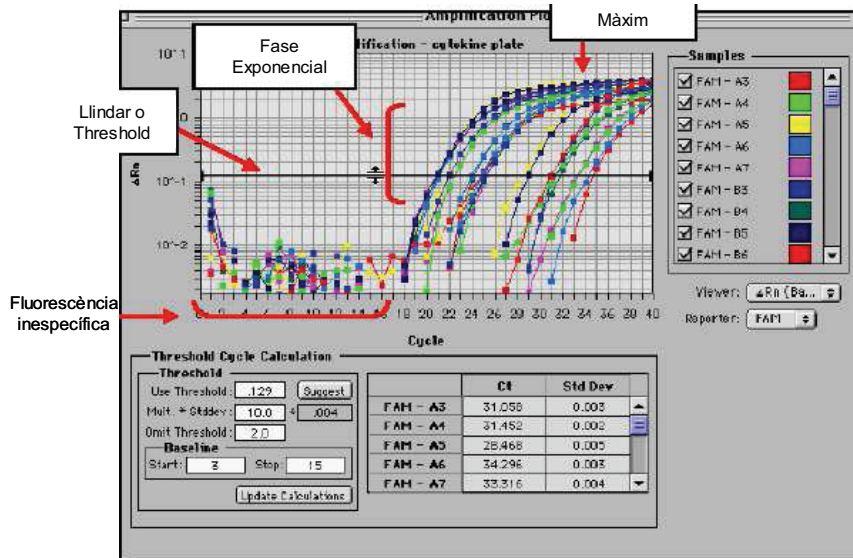
Les condicions generals de la PCR són les següents:

40 CICLES:	Pas inicial	50°C, 2 minuts
	Desnaturalització	95°C, 10 minuts
	Melting	95°C, 15 segons
	Annealing	60°C, 9 minut

#### Anàlisi dels resultats:

Com a resultat s'obté una corba per cada mostra, a l'eix de les ordenades es representa l'increment de fluorescència i a l'eix de les abcises es representa el nombre del cicle o Ct. En una primera fase la fluorescència és indetectable, però a partir d'un determinat cicle de PCR es comença a detectar degut a l'acumulació del producte de PCR, es tracta de la fase exponencial, on l'eficiència de la reacció és del 100%. És en aquesta fase on la valoració de la reacció és més precisa i molt específica. Després d'aquesta

fase exponencial s'observa una fase lineal on els components de la reacció comencen a esgotar-se i l'acumulació del producte és més lenta. Finalment, s'arriba a un màxim on no hi ha acumulació de producte. En la fase exponencial s'estableix un llindar o *threshold*. Aquest valor és arbitrari i el fixa l'investigador per a cada mostra i gen analitzat.



**FIGURA MM-1.** Exemple de la pantalla d'un resultat típic de RT-PCR. S'aprecien les tres fases en que es subdivideix la corba d'amplificació. Una primera fase on la fluorescència que es detecta és inespecífica, una segona fase on la fluorescència es detecta de forma exponencial i una tercera i última fase en que la fluorescència detectada ha arribat al màxim. El cicle en que la fluorescència sobrepassa el llindar o threshold és el Ct (correspon al resultat de la RT-PCR).

El cicle de la PCR en el qual una mostra arriba a sobrepassar el llindar és el que es coneix com a Ct value. El valor de Ct pot relacionar-se amb la quantitat de motlle present a la mostra. Així doncs, a major quantitat de motlle, el Ct serà menor perquè l'amplificació generarà una fluorescència que sobrepassi el llindar en un menor nombre de cicles.

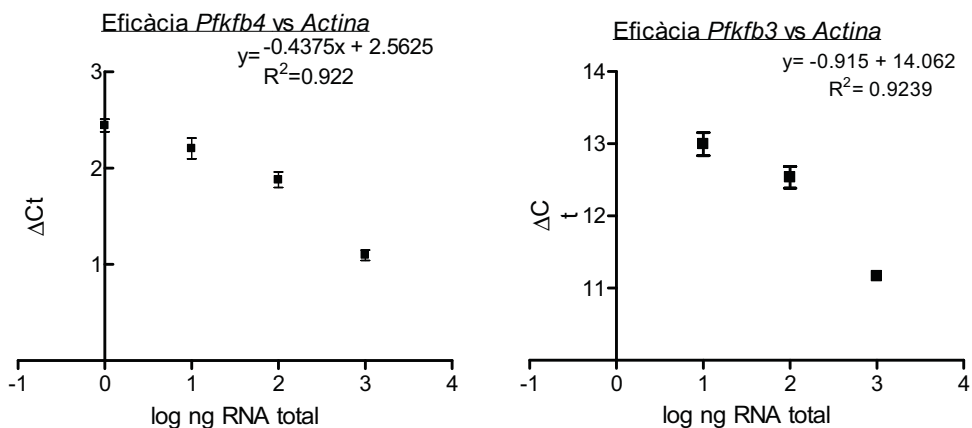
Degut a que la reacció de PCR és exponencial, petites variacions de la quantitat de motlle inicial deriven en grans variacions del resultat final (1unitat de diferència del Ct es correspon al doble de diferència en l'expressió gènica). Per tal d'assegurar que es carrega la mateixa quantitat de cDNA total els resultats s'han de normalitzar enfront d'un gen de referència, el qual no varia d'expressió en les condicions experimentals. Per aquests estudis s'utilitza com a referència el gen de l'Actina.

#### Càlculs dels resultats, quantificació relativa pel mètode del $\Delta\Delta Ct$ :

Per poder utilitzar aquest mètode de quantificació, primer s'ha de comprovar que l'eficiència en l'amplificació de l'oligo del gen diana és semblant a la que té l'oligo del gen de referència (Actina). Per això, es representa una gràfica per cada oligo a partir de la recta patró que s'ha fet: el  $\Delta Ct$  (la mitja de Ct per cada concentració d'RNA de l'oligo del gen diana menys la mitja de Ct per cada concentració de RNA de l'oligo de referència) respecte el logaritme dels nanograms d'RNA total emprats en fer la recta patró. El

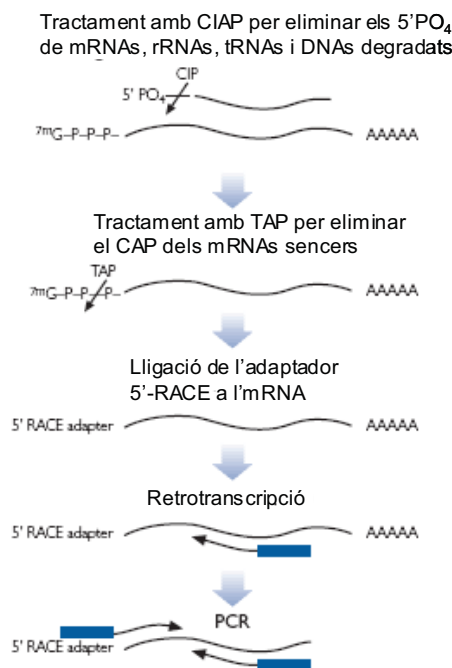
pendent de la recta aconseguida ha de ser inferior a 0.1 per poder usar el mètode del  $\Delta\Delta Ct$  per tal de quantificar l'expressió dels gens diana (*Pfkfb4* i *Pfkfb3*).

Tal com es pot comprovar a les gràfiques de la Figura MM-2, els resultats de RT-PCR obtinguts en aquesta memòria de tesi van ser analitzats pel mètode del  $\Delta\Delta Ct$ , ja que els pendents de les dues rectes són menors de 0.1.



**FIGURA MM-2. Comparació de l'eficiència dels oligonucleòtids *Pfkfb4* i *Pfkfb3* de rata versus Actina de rata.** Es van determinar els valors de Ct per *Pfkfb4*, *Pfkfb3* i Actina a partir d'una mostra de testicle adult de rata. La diferència entre els valors de Ct dels gens versus actina s'ha representat en front el logaritme de la quantitat de mostra utilitzada. La diferència en l'eficiència de la PCR es determina calculant el pendent de la recta, que, en tots dos casos, és menor de 0.1. Per tant es pot aplicar la fórmula del  $\Delta\Delta Ct$  per calcular la quantitat relativa de cada mRNA en les mostres.

### 5'-RACE (Rapid amplification cDNA ends)



Aquest assaig està dissenyat per amplificar cDNA derivats només d'mRNA sencers. Els mRNAs d'una població (en aquest cas de testicle humà) van ser tractats amb l'enzim fosfatasa alcalina (CIAP) per tal d'eliminar el fosfat a 5'- de tots aquells mRNAs que no estiguessin sencers. Després van ser tractats amb fosfatasa àcida (TAP) per tal d'eliminar l'estructura CAP deixant un extrem 5'-monofosfat lliure. Llavors, es va lligar un adaptador de 45 nucleòtids d'RNA sintètic a la població d'RNA (només a aquelles molècules que contenien l'extrem 5'-fosfat). Mitjançant oligonucleòtids degenerats aquesta població de RNA amb l'adaptador va ser retrotranscrita. D'aquesta manera s'aconsegueix obtenir un cDNA provinent de mRNA sencers unit a un adaptador. Aquest protocol que s'acaba de detallar el realitza la casa comercial (Ambion) i es resumeix a la Figura de l'esquerra.

**FIGURA MM-3. Esquema de l'obtenció del cDNA per Ambion**

El protocol de 5' RACE consisteix en realitzar dues rondes de PCR, una primera on s'utilitza la població cDNA de testicle comercial com a motlle i els oligonucleòtids més externs (un que hibrida amb l'adaptador i l'altre que hibrida amb el cDNA). I a la segona ronda de PCR s'utilitza el producte de la primera PCR com a motlle i els oligonucleòtids més interns (un que hibrida amb l'adaptador i l'altre que hibrida amb el cDNA). A la Figura MM-4, s'esquematitza l'estratègia del 5'-RACE.

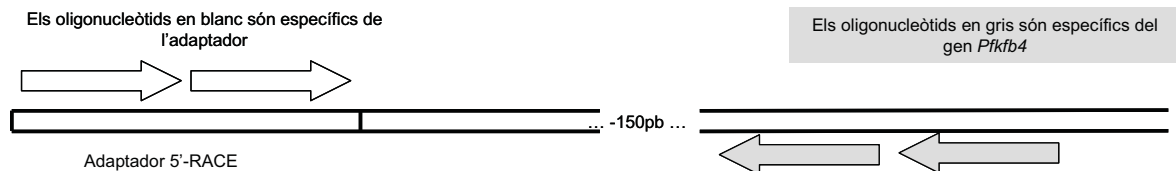


FIGURA MM-4. Esquema de les posicions dels oligonucleòtids utilitzats en el 5'-RACE

Material:

First Choice® RLM RACE kit (Ambion)

Human testes RACE-Ready cDNA (Ambion)

Aigua mQ autoclavada (Nucleasa-free)

Oligonucleòtids 5'-reverse que hibridin amb la seqüència del cDNA de *Pfkfb4* humà

Protocol:

Primera ronda de PCR	Segona ronda de PCR
1µl de cDNA Race Ready	2µl del producte de la primera PCR
5 µl Tampó de PCR 10X	5 µl Tampó de PCR 10X
4 µl dNTPs (25mM cada dNTP)	4 µl dNTPs (25mM cada dNTP)
2 µl de l'oligo extern derivat del gen	2 µl de l'oligo intern derivat del gen
2 µl de l'oligo extern derivat de l'adaptador	2 µl de l'oligo intern derivat de l'adaptador
1.25 U de DNA polimerasa	1.25 U de DNA polimerasa
H2O mQ autoclavada	H2O mQ autoclavada
Volum final 50 µl	Volum final 50 µl

Analitzar els productes de les dues PCR en un gel d'agarosa del 2%

Clonar el producte final de la segona PCR en el vector TOPO-TA i seqüenciar

## PROTEÏNES

### Obtenció d'extractes proteics a partir de teixit

Material:

Politró

Centrífuga refrigerant

Tampó homogenització de mostres: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, EDTA 10 mM, KF 100 mM, pH: 7.1

Inhibidors de proteases:

- PMSF 100 mM en isopropanol (100x), guardat a 4°C
- Leupeptina 5 mg/ml en etanol (1000x), guardat a -20°C
- Pepstantina 5 mg/ml en etanol (1000x), guardat a -20°C
- Aprotinina 5 mg/ml en etanol (1000x), guardat a -20°C
- Benzamidina 5 mg/ml en etanol (1000x), guardat a -4°C
- DTT 1 M en aigua (1000x), guardat a -20°C

Inhibidors de fosfatases:

- NaF 1 M en aigua (1000x), guardat a 4°C
- Ortovanadat sòdic 0.1 M en aigua (1000x), guardat a 4°C
- $\beta$ -glicerol fosfat 1 M en aigua (100x), guardat a 4°C

Protocol:

1. Homogenitzar els teixits, amb el Politró, aproximadament 100 mg de teixit amb 1 ml de tampó d'homogenització suplementat amb els inhibidors de proteases i fosfatases.
2. Centrifugar, 10000g, 4°C, durant 20 minuts. Es recull el sobrenedant en un ependorf nou.
3. Els extractes proteics resultants es poden quantificar directament per a ser analitzades mitjançant Western blot o es poden congelar a -20°C si es processaran en pocs dies o a -80 si és en mesos

### **Obtenció d'extractes proteics a partir de cultius cel·lulars**

Material:

PBS 1X (a partir de PBS 20X: NaCl 140 mM (200 g/L), KCl 2.7 (10 g/L), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (57.2 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM (10g/L))

Tampó de lisi cel·lular: 50mM TrisHCl, pH 6.8; 10% glicerol, 2% SDS

Scrappers

Bloc sec a 90°C

Protocol:

1. Aspirar el medi de les plaques de cultiu i rentar dos cops amb PBS 1X
2. Afegir tampó de lisi (500  $\mu$ l per una placa de 10 cm de diàmetre)
3. Rascar la placa amb els scrappers fins a lisar completament les cèl·lules. La solució adquireix un aspecte mocós degut al trencament del DNA
4. Recollir la lisi cel·lular en un ependorf i escalfar a 90°C al bloc sec. Es deixa atemperar i es poden congelar a -20°C o es poden quantificar directament per a ser analitzades mitjançant Western blot

### **Quantificació dels extractes proteics**

Material:

BSA

Tampó d'homogenització



Reactiu BCA™ Protein Assay (Pierce) o Reactiu Bradford (BIO-RAD Protein Assay)

Lector de plaques

Plaques ELISA

Protocol:

Realitzar el patró de BSA amb el mateix tampó que s'usa per obtenir els extractes

µg/µl, [ ] PATRÓ	0	0.1	0.2	0.5	1	2.5	5
µls BSA (10mg/ml)	0	5	10	25	50	125	250
µls T. homogenitzar	500	495	490	475	450	375	250

El patró es pot guardar a -20°C

- Si el tampó d'extracció conté SDS es quantifiquen les mostres amb **BCA**:

El reactiu de BCA es prepara al moment, barrejant les solucions A i B segons la raó 50:1

En una placa ELISA, de 96 pouets, es posa a cada pouet, per triplicat:

2 µl de patró de BSA + 200 µl BCA

2 µl de mostra + 200 µl BCA

Es deixa la placa a l'incubador a 37°C durant 30 minuts (o fins que pugi el color del reactiu, passi de blau-verdós a lila, la coloració depèn de la concentració de proteïna que tingui la mostra d'aquell pouet)

Lectura de l'absorbància de la placa en el lector a 550 nm de longitud d'ona

- Si el tampó d'extracció no conté SDS, es quantifiquen les mostres amb **Bradford**:

Es prepara una dilució 1:5 de reactiu de Bradford en aigua

En una placa ELISA, de 96 pouets, es posa a cada pouet, per triplicat:

2 µl de patró de BSA + 200 µl Bradford

2 µl de mostra + 200 µl Bradford

Es deixa la placa a temperatura ambient de 5 a 10 minuts

Lectura de l'absorbància de la placa en el lector a 620 nm de longitud d'ona

### Preparació de les mostres a carregar

1. Fer un full d'excel calculant la recta patró d'on s'extrapolen les concentracions de les mostres segons les seves absorbàncies
2. Calcular el volum de mostra necessària segons la quantitat de proteïna que es vol carregar (per exemple: 50 µg). Dividir el valor més alt entre 3 per saber el volum de tampó de càrrega (LSB 4X) que s'ha d'afegir a la mostra. Perquè les mostres tinguin el mateix volum, s'afegeix aigua o tampó d'homogenitzar a aquelles que ho necessitin
3. Escalfar les mostres a 90-100°C durant 10 minuts, en un bloc sec, per a que es desnaturalitzin les proteïnes

4. Abans de carregar el gel, fer una centrifugada a velocitat màxima per a no perdre volum i carregar-les en el gel d'acrilamida

## **WESTERN BLOT**

### **Preparació dels gels**

Netejar els vidres amb etanol, i realitzar el muntatge segons ho descriu el fabricant

Barrejar els següents components (les dades estan calculades per fer dos gels petits, un gel gran es correspon a 4 gels petits):

GEL SEPARADOR:	8%	10%	12.5%
Tampó lower	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml
Acrilamida 40%	2.98 ml	3.75 ml	4.65 ml
H <sub>2</sub> O	8.27 ml	7.50 ml	6.6 ml
S'afegeixen els catalitzadors de la polimerització just abans de posar el gel en el muntatge			
TEMED	25 µl	25 µl	25 µl (1 gel gran: 50 µl)
APS	75 µl	75 µl	75 µl (1 gel gran: 150 µl)

TEMED: donador de radicals, inicia la polimerització APS: amonium persulfat, continua la polimerització

Barrejar bé i ràpidament posar el gel en el muntatge

Posar una mica d'isopropanol a sobre la superfície del gel per tal d'eliminar les possibles bombolles que s'hagin format, a més, també afavoreix que la superfície del gel quedi plana i recta

Quan el gel hagi polimeritzat, s'eliminen les restes d'isopropanol amb un paper de filtre

Barrejar els següents components (les dades estan calculades per a fer dos gels petits, un gran es correspon a 4 gels petits):

GEL CONCENTRADOR o stacking:	3%
Tampó lower	2.00 ml
Acrilamida 40%	0.6 ml
H <sub>2</sub> O	5.40 ml
S'afegeixen els catalitzadors de la polimerització just abans de posar el gel en el muntatge	
TEMED	10 µl (1 gel gran: 20 µl)
APS	40 µl (1 gel gran: 80 µl)

Barrejar bé i ràpidament es posa el gel en el muntatge

Col·locar la pinta sobre el gel, i esperar que polimeritzi, un cop ja ha polimeritzat el gel, es treu la pinta, es posen a la cubeta d'electroforesis i es carreguen les mostres

### **TAULA ORIENTATIVA SOBRE LA CAPACITAT DELS POU:**

Núm de pouets	amplada pouet	0.75 mm	1.0 mm	1.5 mm
10	5.08 mm	33 µl	44 µl	66 µl
15	3.35 mm	20 µl	26 µl	40 µl

### **Electroforesi SDS-PAGE**

Un cop les mostres estan carregades es posa en marxa l'electroforesi. Per a dos gels petits es fixa el voltatge a 120V. És important que l'amperatge no superi els 100 mA.

Es deixa que es faci l'electroforesi fins que el blau de bromofenol de les mostres arribi al final del gel.

Quan l'electroforesi hagi finalitzat, el tampó d'electroforesi es llença, es desmunta el sistema treien els gels i tallant el gel concentrador.

### **Transferència**

Preparar el sandwich en una safata neta amb una mica de tampó de transferència, seguint aquest ordre:

1. casset amb la cara negra a sota
2. esponja mullada en tampó de transferència
3. dos papers Watman mullats amb el tampó de transferència
4. gel
5. membrana prèviament activada (20 segons en metanol, aigua, tampó transferència)
6. dos papers Watman mullats en el tampó de transferència
7. esponja mullada en tampó de transferència
8. tancar el sandwich

Col·locar el sandwich a la cubeta de transferència seguint el codi de colors

Col·locar un gel perquè la temperatura no pugi massa durant la transferència

Omplir la cubeta amb el tampó de transferència fred

Connectar la transferència a la font, fixar l'amperatge a 400 mA i deixar durant 1h-1h 15 minuts en agitació constant

Quan s'hagi finalitzat:

1. Es recupera el tampó
2. Es desmunta el sandwich, obrint per la part blanca
3. Es tenyeix el gel amb Coomasi Blue (deixar en agitació durant 20 minuts i destenyir amb aigua destil·lada). També es pot tenyir la membrana amb Ponceau S abans de fer el bloqueig.
4. Bloquejar la membrana

### **Detecció de les bandes amb anticossos**

Bloquejar la membrana amb una solució de TBS-T amb un 5% de llet en pols (1g de llet en 20 ml), durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació contínua

Incubar la membrana amb l'anticòs primari durant dos hores a temperatura ambient o deixar O/N a 4°C en agitació constant

L'anticòs es dilueix en TBS-T amb un 5% de llet en pols. Si es vol guardar, s'ha d'afegir azida sòdica 0,02% (10 µl azida 20% en 10ml), d'aquesta manera s'evita la putrefacció de la llet

Fer 3 rentats de 10 minuts en TBS-T en agitació

Incubar durant 1 hora a temperatura ambient amb l'anticòs secundari diluït en TBS-T, en agitació. En aquest cas, la solució d'incubació no ha de tenir azida perquè inhibiria la peroxidasa

Fer 2 rentats de 10 minuts en TBS-T en agitació i un tercer rentat, també de 10 minuts, amb TBS

**Revelat amb ECL**

ECL *Western blotting detection system* (Amersham <sup>TM</sup>)

Barrejar 2 ml del reactiu A amb 2 ml del reactiu B abans d'usar (volum per dues membranes)

Assecar una mica la membrana

Posar la barreja de la solució de revelat durant 1 minut sobre la membrana

Ràpidament es posa la membrana a dins un casset i es revela a la cambra fosca

EXPOSICIÓ: posar la membrana en contacte amb el film (es poden provar diferents temps de contacte)

REVELAT: posar el film uns segons en la solució de revelat, fins que es puguin detectar bandes

Rentar amb aigua

FIXACIÓ: posar el film uns segons en la solució de fixació

Esbandidir amb aigua i deixar assecar

També es pot visualitzar el revelat de les bandes amb la màquina *Luniniscent Image Analyzer LAS-3000* (Fujifilm)

**Reactivació de membranes**

Si la membrana està seca, o les proteïnes no tenen el mateix pes molecular:

1. Rentar amb metanol durant 20 segons
2. Rentar amb aigua fins que la membrana s'hidrati (deixi de flotar i s'enfonsi)
3. Rentar amb TTBS, en agitació, durant 5 minuts

Si les proteïnes tenen el mateix pes molecular:

1. Posar la membrana en la solució de Stripping, en un bany húmit amb agitació a 55°C per 30 minuts
2. Rentar amb TTBS 1X, primer fer dos rentats ràpids i després rentats de 10 minuts fins que no s'olori el β-mercaptoetanol

Es continua amb el Western blot a partir del bloqueig

**SOLUCIONS GENERALS de Western blot:**

<b>Tampó electroforesi</b>	<b>Tampó de transferència 10x</b>	<b>Solució d'stripping</b>
Tris 30.3 g/L Glicina 144 g/L SDS 20% 50 ml pH: 8.3	Tris 30.3 g/L Glicina 144 g/L	Tris-HCl 62.5 mM (3 ml de 1M per 50 ml) SDS 2% (5ml de SDS 20% per 50 ml) pH: 7.4 β-mercaptoetanol 160 mM (560 µl de β-mercaptoetanol 14.3M). Afegir al moment
<b>TTBS 20X</b>		<b>TBS</b>
Tris-HCl 200 mM (12.1 g per 500ml) NaCl 3M (87.6 g per 500 ml) pH:7.4 Tween-20 (10 ml per 500 ml)		Tris-HCl 200 mM (12.1 g per 500ml) NaCl 3M (87.6 g per 500 ml) pH:7.4

## Preparació d'òrgans per a immunofluorescència

### Material:

Paraformaldehid 4% en tampó fosfat (PFA 4%)

PBS 1X amb 30% Sacarosa

*Tissue-Tek O.C.T™ compound* (Sakura)

Criomotlles

### Protocol:

1. Després d'eutanasiar els animals i extreure els òrgans, els testicles es renten amb PBS 1X
2. Es fixen els testicles en 25 ml de PFA 4%, a 4°C durant 24 hores
3. Incloure els testicles en 25 ml de PBS 1X – 30% Sacarosa, a 4°C fins que els òrgans deixin de flotar
4. Posar els testicles en els criomotlles en la posició adequada per fer els posteriors talls i es cobreix amb OCT
5. Congelar amb Nitrogen líquid, s'ha d'evitar que el criomotlle toqui directament el nitrogen per tal d'evitar esquerdes en la mostra

## Immunofluorescència de crioseccions

### Material:

Portaobjectes polilisinat

Paraformaldehid 10% en aigua

PBS 1X

PBS 0.1% Tritó

Mowiol

Anticòs primari i secundari

TOPRO III

*Normal goat serum* (Biological Industries)

### NOTES:

És preferible que els portaobjectes estiguin tractats amb poly-l-lysina. S'ha d'empapar els portes amb el producte i deixar-los assecar a la estufa a 37°C. S'ha de recollir els talls amb els portaobjectes secs. Els talls amb el criostat seran de 5-7 micres. Un cop enganxats sobre el portaobjectes es deixen assecar a temperatura ambient durant 10 minuts i després es congelen a -20°C. Es descongelaran el mateix dia de la immunofluorescència i no podran congelar-se de nou.

### Protocol:

1. Atemperar el porta amb les crioseccions
2. Fixar amb 1 ml de paraformaldehid 10% en aigua durant 10 minuts
3. Rentar amb PBS1X no estèril, fer 5 rentats de 2 minuts (cubeta)
4. Permeabilitzar amb 0,1% Tritó en PBS, fer 3 rentats de 5 minuts (cubeta)

5. Bloquejar amb sèrum (ha de coincidir amb l'animal en que s'ha fet l'anticòs secundari, normalment és goat sèrum) diluït 1:5 en PBS, durant 2 hores a temperatura ambient. Es posa un tros de parafilm a sobre i s'incuba en una cambra humida.
6. Incubar amb l'anticòs primari en la cambra humida, a 4°C O/N. L'anticòs es dilueix en sèrum (es poden fer diferents dilucions 1/5, 1/10, 1/25, 1/50)
7. Rentats amb PBS 0,1% Tritó, fer 3 rentats de 5 minuts (cubeta)
8. Incubar amb l'anticòs secundari 1/400 a partir de l'estoc diluït en goat serum junt amb el producte TOPRO III (dilució 1:1000), durant 1 hora a la cambra humida i protegit de la llum
9. Rentats amb PBS 0,1% Tritó, fer 3 rentats de 5 minuts (100 ml en 1 porta)
10. Muntatge del portaobjecte amb el medi de muntatge aquós i que mantingui la fluorescència, com Fluorsave o Mowiol.

NOTA: Es deixa O/N a 4°C tapat de la llum per incrementar la fluorescència.

### Immunohistoquímica de teixits parafinats

#### Material:

Xilol

Alcohol absolut, 96% i 70%

Aigua destil·lada i aigua de l'aixeta

PBS 1X, no estèril

Peroxidasa (Sigma)

Metanol

Citrat sòdic, pH: 6

Olla a pressió i fogó o vas de precipitat i una placa calefactora

PBS-Tween 0.2 %

*Normal Goat Serum* (NGS)

Dako REAL™ En Vision™. *Detection system peroxidase* (DAB) Rabbit-Mouse (Dako)

Hematoxilina (Fluka) (filtrar abans d'usar)

DPX *mountant for histology* (Fluka)

#### Protocol:

1. Desparafinar en xilol, 4 rentats de 5 minuts
2. Hidratació: 5 minuts en cada alcohol ( 3x EtOH absolut, 3x EtOH 96%, 1x EtOH 70%)  
5 minuts en aigua destil·lada  
Rentats en PBS 1X, 3 rentats de 5 minuts (pot estar-hi més temps)
3. Bloquejar amb peroxidasa durant 10 minuts, mantenir a la foscor  
(200 ml: 140 ml PBS 1X + 58 ml de Metanol + 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) al 3% en aigua destil·lada)
4. Rentats: 10 minuts amb aiguadestil·lada (pot estar més temps)  
PBS 1X, 3 rentats de 5 minuts

5. Desenmascarament de l'antígen amb citrat sòdic, s'ha de disoldre en 1 litre d'aigua destil·lada i ajustar el pH amb àcid cítric fins a 6.  
Es col·loca a l'olla a pressió el litre de citrat sòdic i els portes (en un suport de plàstic, a més han d'estar equilibrats (x2)). Quan comenci a xiular es deixa 2 minuts i immediatament es retira i es refreda a temperatura ambient. Es deixa atemperar uns 30 minuts. Es pot deixar O/N en el citrat. Si s'utilitza el vas de precipitat s'han de deixar les mostres entre 20 i 30 minuts bullint en el citrat sòdic
6. Rentats: PBS 1X, 3 rentats de 5 minuts  
PBS-T 0.2 %, 3 rentats de 5 minuts
7. Bloquejar amb sèrum al 10% en PBS-T 0.2%, tancar els portaobjectes amb parafilm per 2 hores en una cambra humida
8. Incubar amb l'anticòs secundari diluït en PBS-T 0.2% i NGS 1%, O/N a 4°C
9. Atemperar durant 30 minuts tapat de la llum
10. Rentats: PBS-T 0.2 %, 3 rentats de 5 minuts  
PBS 1X, 3 rentats de 5 minuts
11. Per augmentar la senyal, s'utilitza el producte En Vision (2 gotes sobre el teixit durant 30 minuts)
12. Rentats: PBS 1X, 3 rentats de 5 minuts
13. 20 µl DAB + 1 ml de la solució del kit (Posar 100 µl en cada porta (màxim durant 3'))
14. Rentar amb aigua en una cubeta gran
15. Contrastar amb Hematoxilina durant 15 segons
16. Rentar amb aigua, assecar una mica
17. Deshidratar: 1 minut en cada alcohol de concentració creixent  
3 minuts en cada xilol, en l'últim es deixa 30 minuts
18. Muntatge amb DPX.

**Taula MM-1: Taula resum dels anticossos que s'han usat, l'empresa proveïdora, i la seva especificitat. En blanc estan els anticossos primaris i en gris els anticossos secundaris.**

Anticòs	Referència	Dilució		Especificitat
		Western	Immunofluorescència	
anti-L-PFK-2 (PFKFB1)	Santa Cruz	1:250		Humà, rata, ratolí
anti-uPFK-2 (PFKFB3)	Generat al laboratori	1:100	1:50	Humà, rata, ratolí
anti-tPFK-2 (PFKFB4)	Generat al laboratori	1:100	1:10	Humà, rata, ratolí
anti- tubulina	Sigma	1:4000		Humà, rata, ratolí
anti-goat IgG Horseradish Peroxidasa	Santa Cruz	1:5000		cabra
anti-mouse IgG Horseradish Peroxidasa	GE Healthcare	1:5000		ratolí
anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidasa	GE Healthcare	1:5000		conill
<b>Alexa Fluor® 488</b>	Invitrogen. Molecular Probes		1:400	conill

## Tinció Hematoxilina

### Material:

PBS 1X

Aigua destil·lada

Hematoxilina (Fluka) (filtrar abans d'usar)

Mowiol

Cubetes

Protocol:

A partir de les preparacions anteriors:

1. Deixar O/N els portaobjectes en PBS1X, per poder desenganxar els cubres
2. Rentar amb aigua destil·lada
3. Cobrir el tall amb Hematoxilina, 5 minuts
4. Rentar abundantment amb aigua de l'aixeta fins que no hi quedin restes d'hematoxilina
5. Muntatge amb Mowiol ( no fa falta deshidratar)

Resultat: Els Nuclis es veuran de color blau

### **Preparació de Mowiol**

Material:

Glicerol

Mowiol

Aigua destil·lada

Azida Sòdica

Protocol:

1. Posar 6g de glicerol (P:1.23g/ml => 4.88ml) en un tub falcon de 50 ml i afegir una barra magnètica.
2. Afegir 2.4 g de Mowiol, agitar fins que es barregin
3. En agitació, afegir 6 ml d'aigua destil·lada i deixar 2 hores a temperatura ambient
4. Afegir 12 ml de 0.2 M Tris (pH: 8.5)
5. Afegir Azida Sòdica fins que la concentració final sigui 0.02%
6. Incubar el tub en aigua a 50-60°C durant 10 minuts per tal de dissoldre el Mowiol. El procés es repetiria durant varies hores si fos necessari
7. Centrifugar a 5000 g durant 15 minuts per eliminar sòlids no dissolts
8. Aliquotar en ependors (1ml/ependorf). Guardar a -20°C
9. Atemperar els tubs a temperatura ambient previ al seu ús
10. Els tubs oberts es poden guardar a 4°C aproximadament 1 mes. S'ha de llençar quan el material hagi cristal·litzat
11. Deixar els portes amb els cubres un cop fet el muntatge O/N protegits de la llum abans de mirar pel microscopi per tal d'incrementar la unió

NOTA: No fer servir massa Mowiol a l'hora de fer el muntatge ja que els cubres flotarien. Normalment amb 15-20 µl és suficient per cobrir 22 x 22 mm, per cubres de 22 x 50 mm es necessita aproximadament 40-50 µl.



## Cultius Cel·lulars

### LÍNIES CEL·LULARS

#### Material:

DMEM (1.5gr/l bicarbonat sòdic, 4.5 gr/l glucosa) (Biological Industries)

DMEM/F-12 (1.5gr/l bicarbonat sòdic, 4.5 gr/l glucosa) (Biological Industries)

Ham F12 (Biological Industries)

OPTIMEM (Gibco)

Sèrum fetal boví (FBS) (Biological Industries)

Sèrum de cavall (HS) (Biological Industries)

Piruvat sòdic (Na-Pyr) (Biological Industries)

L-Glutamina (Biological Industries)

Penicil·lina/Estreptomina (Biological Industries)

Dimetil sulfòxid (DMSO) (Sigma)

Vials de criopreservació (Nunc)

Plaques de cultiu TPP de 100 mm pel manteniment de les línies cel·lulars i plaques de 6 i 24 pous pels experiments de transfecció

Tripsina (Biological Industries)

### Cultiu de Línies cel·lulars

A partir de 500 mls de medi DMEM o DMEM/ HAM-F12

Treure 100 mls de DMEM sense suplementar (SFM) i afegir:

TM-4, 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	GC-1, 37°C, 10% CO <sub>2</sub>	GC-2, mEF HIF (+/+) i mEF HIF (-/-), 37°C, 10% CO <sub>2</sub>
2mM L-Glutamina, estoc 200mM (4ml)	4mM L-Glutamina, estoc 200mM (8ml)	4mM L-Glutamina, estoc 200m, (8ml)
5% Horse Serum (20ml)		
2.5% FCS (10ml)	10% FCS, (40ml)	10% FCS, (40ml)
1mM Na-Pyr, estoc 100mM (4ml)	1mM Na-Pyr, estoc 100mM (4ml)	
1mM Penicil·lina/Estreptomina (4ml)	1mM Penicil·lina/Estreptomina (4ml)	1mM Penicil·lina/Estreptomina (4ml)
15mM (92.5%) Hapes (6ml)		

### Criopreservació

A partir de plaques 10TPP d'una confluència aproximada del 100%:

1. Aspirar el medi
2. Rentar, dos cops, amb PBS 1X
3. Afegir 1ml de Tripsina, deixar actuar un parell de minuts a 37°C, si les cèl·lules no es desenganxen es pot colpejar suaument la placa

4. Aturar la reacció amb 1-2 ml de medi complet, pipetejar per acabar de desenganxar-les i trencar els possibles grumolls que s'hagin format
5. Recollir les cèl·lules en un falcon (15 o 50 ml depenen del volum que hi hagi), afegir PBS 1X fins al volum final del falcon per tal de diluir la tripsina
6. Centrifugar a 1400 rpm durant 3 minuts (900g durant 5 minuts)
7. Aspirar el medi
8. Resuspendre el pèl·let amb medi complet suplementat amb:

100 µls sèrum (20%)  
800 µls medi  
100 µls DMSO (10%)

Hi ha tants tubs de congelació com plaques inicials

ORDRE a seguir en la ressuspensió:

Sèrum

Medi+DMSO, s'afegeix gota a gota perquè el DMSO és tòxic

S'aliquota, 1ml, en cada tub de congelació (criotubs)

### Descongelació

1. Previ a la descongelació, s'han de preparar les plaques amb 10 ml de medi complet
2. Descongelar el critub a 37 °C (bany) fins a un 70% de descongelació
3. Afegir 1 ml de medi complet, gota a gota, al criotub para acabar de descongelar
4. Passar toda la barreja cel·lular a la placa i pipetejar per finalitzar la descongelació, i si fos necessari, disseminar les cèl·lules per tota la placa de cultiu perquè no formin grups en enganxar-se

### Tripsinizació i passí de les línies cel·lulars

1. A partir de plaques 100 mm d'una confluència aproximada del 100 %
2. Aspirar el medi
3. Rentar, dos cops, amb PBS 1X
4. Afegir 1 ml de Tripsina, deixar actuar un parell de minuts a 37°C, si les cèl·lules no es desenganxen es pot colpejar suaument la placa per ajudar-les
5. Aturar la reacció amb 1 ml de medi complet, pipetejar per acabar de desenganxar-les i per trencar els possibles grups cel·lulars que s'hagin format
6. En plaques 100 mm noves, posar 10 ml de medi complet, i afegir al voltant de 300 µl de la barreja cel·lular. Aquest volum pot variar depenen de la confluència que es desitgi obtenir. Plaquejant els 300 µl s'han de tornar a passar en dos dies.

### Condicionament de medis de cultiu

Material:

Medi de cultiu DMEM/F-12 (Gibco)

Sèrum fetal boví (FBS) (Biological Industries)

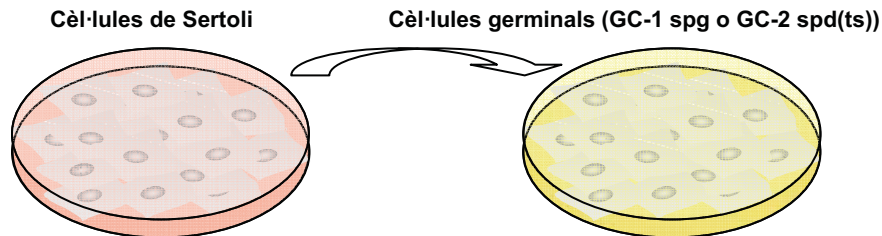
Sèrum de cavall (HS) (Biological Industries)

5- $\alpha$ -dihidrotestosterona (Fluka)

Cèl·lules de Sertoli: TM-4

Cèl·lules germinals: GC-1 spg o GC-2 spd (ts)

Protocol:



1. Cultivar les cèl·lules de Sertoli en medi DMEM/F12 durant 24 o 48 hores
2. Aspirar el medi i centrifugar per eliminar les cèl·lules mortes, 1500 rpm durant 10 minuts
3. Recollir el sobrenedant: **MEDI CONDICIONAT** (CM) de Sertoli i congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins a la seva utilització
4. Creïxer les cèl·lules germinals en el medi condicionat de Sertoli durant 24 hores

Medis utilitzats:

MEDI de cultiu per TM-4	MEDI de cultiu per GC-1 spg i GC-2 spd(ts)
Basal: DMEM/F-12	Medi condicionat basal (BCM)
Sèrum: DMEM/F-12 i 2.5% FBS i 5% HS	Medi condicionat amb Sèrum (SCM)
5- $\alpha$ -Dihidrotestosterona, DHT: DMEM/F-12 i $10^{-9}\text{M}$ DHT	Medi condicionat amb testosterona (TCM)
	Basal: DMEM
	Sèrum: DMEM i 10% FBS
	5- $\alpha$ -Dihidrotestosterona, DHT: DMEM i $10^{-9}\text{M}$ DHT

## Transfeccions

Material:

OPTIMEM (Gibco)

PBS 1X estèril

Agent vehiculitzant (Lipofectamina 2000, PEI (polietilenimina), Lipofectina, FUGENE 6)

NaCl 150 mM estèril

DMEM (Biological Industries)

LIPOFECTAMINA 2000 / LIPOFECTINA (Invitrogen).

1. Es planten les cèl·lules en plaques de 6 pous ( $9.5\text{ cm}^2/\text{pou}$ ;  $9.5 \cdot 10^5$  cèl·lules/pou) el dia abans de la transfecció

2. Es transfecten seguint les instruccions del fabricant, a la proporció de 1µg de DNA de la construcció promotora conjuntament amb 60 ng de β-galactosidasa (per corregir les lectures de luciferasa) per 2 µl de Lipofectamina 2000, a cada pou.  
Per a les cèl·lules TM4 i GC-1 no cal canviar el medi de transfecció (OPTIMEM) però, a les cèl·lules GC-2 s'ha de canviar el medi de transfecció passades les 5 hores pel propi medi de cultiu (DMEM, 10% FBS i 4 mM Glutamina).
3. Al dia següent, les cèl·lules transfectades es subdivideixen, es passen a plaques de 24 pous (1.9 cm<sup>2</sup>/pou; 1.9·10<sup>5</sup> cèl·lules/pou) segons la raó 1 pou de la placa de 6, per 6 pous de la placa de 24. Després de 6 hores, es comprova el seu estat d'adhesió i es canvia el medi de cultiu per un medi basal sense sèrum durant tota la nit.
4. Es tracten les cèl·lules entre 16-24 hores, depenent del tractament triat.
5. Es lisen les cèl·lules i es procedeix a fer les lectures d'activitat luciferasa i β-galactosidasa, amb els respectius kits.

### PEI

1. Es planten les cèl·lules en plaques de 6 pous (9.5 cm<sup>2</sup>/pou; 9.5 · 10<sup>5</sup> cèl·lules/pou) el dia abans de la transfecció
2. Es prepara la barreja de transfecció segons la raó següent:
3. Diluir 1µg de DNA de la construcció promotora més 60 ng de β-galactosidasa amb NaCl 150 mM
4. Diluir PEI amb NaCl 150 mM
5. Vortejar els dos ependorfs durant 10 segons i passar el PEI a l'ependorf de DNA
6. Vortejar l'ependorf amb DNA més PEI
7. Deixar 10 minuts a temperatura ambient
8. Rentar les cèl·lules amb PBS dos cops i afegir 500 µl d'OPTIMEM a cada pou
9. Afegir 50 µl de la barreja de transfecció a cada pou
10. Canviar el medi de transfecció per a les cèl·lules GC-2 mentre que per a les cèl·lules TM4 i GC-1 no cal canviar-ho
11. Subdividir les cèl·lules a plaques de 24 pous (1.9 cm<sup>2</sup>/pou; 1.9·10<sup>5</sup> cèl·lules/pou) segons la raó 1 pou de la placa de 6, per 6 pous de la placa de 24. Després de 6 hores, es comprova el seu estat d'adhesió i es canvia el medi de cultiu per un medi basal sense sèrum durant tota la nit.
12. Es tracten les cèl·lules entre 16-24 hores, depenent del tractament triat.
13. Es lisen les cèl·lules i es procedeix a fer les lectures d'activitat luciferasa i β-galactosidasa, amb els respectius kits.

### FUGENE 6 (Roche).

1. En un Eppendorf afegir 97 µl de medi sense FBS i 3 µl de FuGene.
2. En un altre Eppendorf afegir la quantitat de DNA desitjada (1-2 µg si es tracta d'un plàsmid).

3. Deixar 5 minuts a temperatura ambient.
4. Deixar caure el medi amb FuGene sobre el DNA gota a gota amb l'ajuda de la pipeta i deixar 15 minuts a temperatura ambient.
5. Rentar la placa i afegir 600  $\mu$ l de medi sense FBS per pou.
6. Afegir la mescla als pous.
7. Esperar 2-3 hores i afegir 2 ml de medi complet.

### Lectures de Luciferasa

#### Material:

*Kit Luciferase Assay System* (Promega)

*Cell culture lysis reagent 5X* (Promega)

Luminòmetre TD 20 / 20 (Turner Designs)

PBS 1X no estèril

#### Protocol:

RECONSTITUCIÓ: Afegir 10 ml del buffer d'activitat luciferasa al sustrate

Dividir el contingut en dos, i afegir 5 ml d'aigua mQ estèril, s'ha de protegir de la llum

Guardar al congelador: -20°C, si s'utilitza en els pròxims dies

-80°C si no s'usarà pròximament

ÚS: Aspirar el medi de cultiu i rentar amb PBS 1x no estèril

Es passen 100  $\mu$ l de buffer de lisis/pouet de 24 pous

30 minuts en agitació, tapat de la llum

Afegir, en un endorf, 50  $\mu$ l del lisat cel·lular més 50  $\mu$ l del buffer de lectura

Llegir al luminòmetre, amb les següents condicions: 10 segons de *delay* i de *integrate time*.

### Lectures de $\beta$ -Galactosidasa

#### Material:

*Luminescent beta-galactosidase detection kit II* (Clontech)

Luminòmetre TD 20 / 20 (Turner Designs)

#### Protocol:

Es contransfecta 60 ng de plàsmid  $\beta$ -galactosidasa per cada 1  $\mu$ g de DNA

A l'hora de fer la lectura:

Barrejar:

(98  $\mu$ l buffer + 2  $\mu$ l reagent substrat) /pou. Barrejar

Afegir en un endorf entre 2 i 5  $\mu$ l del lisat cel·lular que prové de la lectura de luciferasa més 100  $\mu$ l de la barreja dels agents de lectura  $\beta$ -galactosidasa.

Agitar i deixar incubant una hora, a temperatura ambient, tapat de la llum

LECTURA: Es deixen els mateixos paràmetres de lectura que s'havien fet servir per llegir la luciferasa

---

## Obtenció de mostres d'animals

---

Tots els protocols en que s'han emprat animals d'experimentació han sigut aprovats per la comisió ètica de la Universitat de Barcelona.

### **Separació de cèl·lules testiculars** (Modificat de Bellve et al., 1977)

#### Material:

Rates Sprague-Dawley de 30 i 90 dies.

DMEM (Biological Industries)

Bisturí i pinces

Colagenasa (Sigma)

Hialuronidasa (Sigma)

DNAsa I (Sigma)

Sèrum fetal boví (FBS)

Colorant Trypan blue (0.015 g / ml PBS)

Gases estèrils i llana de vidre

#### Protocol:

1. Anestesià la rata, via intramuscular
2. Extirpar els testicles i mantenir-los en medi DMEM a 25°C. A partir d'ara es treballa sota la campana i en condicions d'esterilitat
3. Descapsular els testicles i procedir a disgregar mecànicament el teixit mitjançant un bisturí i pinces
4. Posar el teixit disgregat en un tub falcon de 50 ml amb 40 ml de medi DMEM, deixar que sedimentin els túbuls per gravetat i eliminar l'excés de medi
5. Dispersar els túbuls amb colagenasa (25 ml de medi DMEM amb 0.5 mg/ml d'enzim) a 25°C en agitació constant durant 15 minuts. Deixar sedimentar els túbuls
6. Recollir el sobrenedant i centrifugar a 180 g durant 5 minuts
7. Elimnar el sobrenedant. El pèl·let conté les cèl·lules intersticials, es congela a -80°C
8. Els túbuls seminífers es renten tres cops amb 40 ml de DMEM
9. Digerir per segona vegada amb la solució de colagenasa, (25 ml de medi DMEM amb 0.5 mg/ml d'enzim) a 25°C en agitació constant durant 30 minuts. Deixar sedimentar els túbuls
10. Recollir el sobrenedant i centrifugar a 180 g durant 5 minuts
11. Elimnar el sobrenedant. El pèl·let conté les cèl·lules peritubulars, es congela a -80°C
12. Els túbuls seminífers es renten dos cops amb 40 ml de DMEM
13. Rentar una tercera vegada els túbuls amb una solució que conté sèrum fetal boví (FBS) (20 ml, 10% in DEMEM, pH 7.4). Deixar sedimentar els túbuls durant 5 minuts
14. Incubar els túbuls en una solució amb un nou cóctel enzimàtic (0.1% colagenasa, 0.2% hialuronidasa, 0.04% Dnasa I, i 10% sèrum fetal boví en 25 ml de medi DMEM, pH 7.4. En agitació constant, a 34°C durant 30 minuts

15. Centrifugar a 180 g durant 5 minuts, el sobrenedant conté les cèl·lules germinals i el pèl·let conté les cèl·lules de Sertoli, que es congelen a  $-80^{\circ}\text{C}$
16. Les cèl·lules germinals es centrifuguen a 180 g durant 5 minuts
17. El pèl·let de cèl·lules germinals es resuspen amb medi DMEM i es filtra a través d'una gasa estèril per tal d'eliminar agregats de cèl·lules de Sertoli contaminants. Per tal de minimitzar les possibles contaminacions amb espermatozoides es torna a filtrar la solució enriquida en cèl·lules germinals a través de llana de vidre. L'eluït es centrifuga a 180 g durant 5 minuts i es congela a  $-80^{\circ}\text{C}$

**NOTA:** Abans de congelar cada pèl·let cel·lular s'ha de controlar la viabilitat cel·lular mitjançant l'observació al microscopi de l'exclusió del colorant *Trypan blue* per part de les cèl·lules vives

## Preparació i incubació d'espermatozoides

### Material:

Medi KRH

Colorant *Trypan blue* (0.015 g / ml PBS)

Gases estèrils

Glucosa

### Protocol:

1. Anestesià la rata, via intramuscular
2. Extirpar els testicles i mantenir-los en medi KRH a  $25^{\circ}\text{C}$
3. Obtenir els espermatozoides de l'epidídim. Tallar l'epidídim en petits fragments i dispersar els espermatozoides pipetejant. Seguidament eliminar els fragments de teixit filtrant a través d'una gasa estèril. Posteriorment centrifugar a temperatura ambient, a 500 g durant 15 minuts. Eliminar el sobrenedant i el pèl·let (els espermatozoides) es resuspenen en 5 ml de medi KRH
4. Comprovar la viabilitat espermatogènica per exclusió del colorant *Trypan blue*
5. En vials de vidre, de 20 ml de capacitat, posar 3 ml de medi KRH més  $8 \cdot 10^5$  cèl·lules més la concentració de glucosa que correspongui (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 i 5 mM Glucosa). S'utilitzen dos vials per cada concentració de glucosa

### Solucions:

<b>Medi Krebs- Henseleit Buffer (KRH).</b>
Adaptat de Phillippe et al., 1986.
NaCl 120 mM
CaCl <sub>2</sub> 2 mM
KCl 5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.2 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1.2 mM
HEPES 25 mM
pH:7.5

## Cultiu d'espermatozoides

### Material:

Vials de vidre

Medi KRH

Glucosa

Bany amb agitació

### Protocol (modificat de Phillippe et al 1986):

Es mantenen les cèl·lules en vials amb medi KRH sense glucosa en un bany amb agitació a 90 cicles/min i a 34 °C durant 30 minuts

Passat aquest període de preincubació, s'afegeix la concentració de glucosa necessària a cada punt (2 vials/punt)

Incubar amb la glucosa durant 30 minuts mantenint les mateixes condicions d'agitació i temperatura

## Obtenció de mostres (Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> i Lactat)

### Material:

NaOH 1M

Tampó àcid: HClO<sub>4</sub> 20%

### Protocol:

Fructosa 2,6-P<sub>2</sub>: 1ml de mostra més 500  $\mu$ ls de NaOH 1M (en aquest punt es pot congelar a -20°C)  
Escalfar a 80°C durant 10 minuts  
Centrifugar a 14000 rpm durant 5'  
MESURAR

Lactat: 1ml mostra més HClO<sub>4</sub> segons la raó: 1/3 volum d'àcid més 2/3 volum de mostra  
MESURAR

## Determinació de Lactat

### Material:

Tampó àcid: HClO<sub>4</sub> 20%

Tampó neutralitzador: 3 M KOH, 3 M KHCO<sub>3</sub>, pH 5

Tampó reacció: 0.3 M Sulfat d'Hidrazina, 0.87 M Glicina, 2.5 mM NAD<sup>+</sup>, 0.19 mM EDTA, pH: 9.5.

Patró de lactat: 20, 80, 120 mg/dl

Enzim LDH 700 U/ml

### Protocol:

1. 1ml de mostra més tampó àcid (500  $\mu$ l)
2. Centrifugar a 14 000 rpm, 4°C durant 10 minuts
3. Neutralitzar el sobrenedant amb el tampó de neutralització, fins que el pH sigui 5-6 (s'ha d'anotar el volum adicional)



4. Centrifugar a 14 000 rpm, 4°C durant 10 minuts
5. Barrejar en una placa Elisa: 350 µl de tampó de reacció més el patró / la mostra (prèviament portada a un volum de 75 µl amb aigua destil·lada (20 µl mostra més 55 µl aigua))
6. Lectura a 340 nm (PUNT ZERO)
7. Afegir 25 ml de l'enzim LDH diluït 1/4 en aigua destil·lada
8. Incubar durant 20 minuts
9. Tornar a llegir (PUNT 30 minuts)

$$[\text{Lactat}] \text{ (mM)} = A1 - A0 * \text{factor de dilució.}$$

Si la mostra: 20µl mostra / 55 µl de aigua (75 µl mostra llegida)

$$75 \mu\text{l} / 20\mu\text{l} = 3.5 \text{ FACTOR DILUCIÓ}$$

### Determinació de Fructosa-2,6-P<sub>2</sub>

#### Material:

PBS 1X fred

Tampó Bàsic (100 mM NaOH, 0,1% Tritó X-100).

Tampó de Reacció (50 mM Tris-acètic, 0,15 mM NADH, 2 mM acetat magnèsic, 1 mM Fru-6-P, 2,5 mM Gluc-6-P, 0,5 mM PPI, 1,7 U/ml G3PDH, 5 U/ml TPI, 1 U/ml Aldolasa, 10 mU/ml PPI-PFK, pH 7,8).

Patró de 0, 0.5, 1, 1.5, 2 i 4 mM de Fru-2,6-P<sub>2</sub>

Protocol (adaptació de Van Schaftingen, et al., 1982):

1. Lisar les cèl·lules, 1ml de mostra amb 0.4 ml de tampó bàsic
2. Escalfar les mostres 10 min a 80°C i centrifugar 15 min a 14000 rpm, recollir el sobrenadant
3. Neutralitzar el sobrenadant amb acètic/acetat fins a pH: 7.5-8
4. Centrifugar la mostra neutralitzada, 5 min a 14000 rpm, recollir el sobrenadant
5. Per fer la lectura barrejar en una cubeta de plàstic:

BLANC	PATRÓ	MOSTRES
750 µl Tris/acetat sense NADH	125 µl H <sub>2</sub> O mQ	110 µl H <sub>2</sub> O mQ
190 µl H <sub>2</sub> O mQ	50 µl substrats	50 µl substrats
10 µl PPI-PFK	50 µl enzims auxiliars	50 µl enzims auxiliars
50 µl PPI	700 µl Tris/acetat amb NADH	700 µl Tris/acetat amb NADH
	15 µl patró	30 µl mostra
	10 µl PPI-PFK	10 µl PPI-PFK
	50 µl PPI	50 µl PPI

6. Mesurar espectofotomètricament a 340 nm

### Obtenció de l'enzim PPI-PFK de la patata

#### Material:

Patates

Liquidadora

Tampó d'homogenització: Tris-acetat 20 mM, pH:8.2, Acetat-Mg 1 mM, DTT 2 mM

Polietilenglicol (PEG<sub>6000</sub>)

Glicerol

KOH 1M HCl 1 M

PPI-Na 10 mM

### Protocol:

1. Pelar de 400 a 500 gr de patates i liquar-les
2. Filtrar la patata liquada amb gases estèrils i mesurar el volum (volum 1)
3. Afegir PPI i MgCl<sub>2</sub> fins que la concentració final sigui de 2 mM
4. Ajustar el pH a 8.2 amb KOH 1M
5. Introduir la solució en un bany d'aigua a 70°C i escalfar fins que s'assoleixin els 59°C. Mantenir en aquesta temperatura durant 5 minuts agitant suaument
6. Refredar ràpidament en un bany amb gel. Ajustar el pH a 7.1 en fred amb HCl 1M. Mesurar el volum (volum 2)
7. Mantenir la solució a 4°C agitant suaument. Afegir lentament PEG<sub>6000</sub> fins a una proporció final 5-6% (pes:volum). Un cop dissolt el PEG<sub>6000</sub> es deixa agitant durant 15 minuts a la cambra freda
8. Repartir el volum en tubs de centrifuga i deixar reposar 10 minuts a la cambra freda. Centrifugar a 6000 rpm durant 10 minuts, a 4°C.
9. Recollir el sobrenedant i mesurar el volum (volum 3)
10. Afegir lentament PEG<sub>6000</sub> fins arribar al 10% de concentració. Un cop dissolt el PEG<sub>6000</sub> es deixa agitant per 15 minuts a la cambra freda
11. Repartir el volum en tubs de centrifuga i deixar reposar 10 minuts a la cambra freda. Centrifugar a 6000 rpm durant 10 minuts, a 4°C.
12. Dissoldre el sediment amb el tampó d'homogenització
13. Centrifugar a 15000 rpm durant 15 minuts, mesurar el volum de sobrenedant (volum 4). En aquest sobrenedant es troba l'enzim PPI-PFK útil.
14. Afegir Glicerol fins a una concentració final del 20%. Aliquotar i guardar a -80°C

### **Dessalació dels enzims auxiliars utilitzats en la determinació de la concentració de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub>**

En la determinació de la concentració de Fructosa 2,6-P<sub>2</sub> és necessari dessalar prèviament els enzims auxiliars que s'utilitzen per tal d'evitar interferències amb les sals de sulfat amònic que tenen les suspensions comercials. Per tal de dur a terme el dessalat es realitza una cromatografia de gel filtració en Sephadex G-25 fine.

#### Preparació de les columnes:

Les columnes són xeringues de 5 ml amb l'extrem tapat amb llana de vidre. A dalt es posa el gel de Sephadex G-25 prèviament hidratat en aigua durant 24 hores. Una vegada els tubs estan plens de gel fins

als 5 ml, es coloquen les xeringues en tubs de vidre per poder centrifugar a 3000 rpm, a 4°C durant 2 minuts i eliminar l'excés d'aigua.

Protocol:

1. Barrejar un volum de G3PDH amb quatre volums de la solució d'Aldolasa
2. Centrifugar a 15000, a 4°C durant 5 minuts
3. Resuspendre el pèl·let amb tampó Tris/Acetac amb un volum final idèntic a l'inicial
4. Posar 250 µl de solució enzimàtica en cada columna i centrifugar a 3000 rpm, a 4°C durant 5 minuts
5. Ajudar els eluïts per homogeneïtzar les diferències
6. Aliquotar l'enzim concentrat i congelar a -20°C
7. Per l'assaig de Fru-2,6-P<sub>2</sub> es dilueixen 1:10

## **Anàlisi immunohistològic d'espermatozoides**

Material:

Portaobjectes polilisinats

Paraformaldehid 4% en PBS

PBS 1X

PBS 0.5% Tritó

Mowiol

Anticòs primari i secundari

*Normal goat serum*

Protocol:

1. Centrifugar la suspensió d'espermatozoides a 649 g durant 1 minut, descartar el sobrenedant
2. Fixar el pèl·let amb 4% de paraformaldehid en PBS
3. Aplicar en un porta i deixar sedimentar a 4°C durant 40 minuts
4. Rentar amb PBS 1X
5. Assecar els espermatozoides a 36°C per incrementar l'adhesió
6. Rentar amb PBS 1X
7. Incubar amb 2% normal goat serum en PBS que conté 0.5 % Tritó X-100 durant 30 minuts
8. Incubar amb l'anticòs primari, dins una cambra humida a 4°C O/N
9. Rentar amb PBS 1X, 3 rentats de 5 minuts
10. Incubar amb l'anticòs secundari
11. Rentar amb PBS 1X
12. Muntatge amb Mowiol

NOTA: Els portes muntats es guarden en una caixa plana protegits de la llum, un cop el medi de muntatge està sec, es poden guardar a 4°C per mantenir més temps la fluorescència. Com a control negatiu, en ambdós casos, no s'incuba amb l'anticòs primari

---

## Producció d'Anticossos Policlonals contra PFKFB4

---

### Obtenció d'anticossos policlonals contra la PFKFB4

Material:

PBS 1X

Adjuvant complet i incomplet de Freund, Sigma.

Antigen peptídic (NH<sub>2</sub>)-YSNGRPALHASQRGCVM-(COOH) sintetitzat i conjugat a KLH pel Servei de Síntesi de Pèptids de la Universitat de Barcelona.

Tubs vacutainers

Animals: Conills *New Zealand*. És recomanable utilitzar dos conills per anticòs generat.

Protocol:

1. Després de 15 dies de quarantena, s'extreu 10 ml de sang de l'animal (Sèrum pre-immune)
2. Preparar l'emulsió de l'antigen en adjuvant complet de Freund en la primera immunització i incomplet a les següents. L'emulsió consta de 2 ml (50% antigen i 50% Adjuvant) i es prepara just en el moment per agitació dels components en un tub de vidre amb un vòrtex fins que en tirar una gota en un got d'aigua aquesta no es disgrega
3. Injectar els 2 ml en el llom de l'animal
4. Repetir la immunització tres cops més separades per dues setmanes. L'última dosi es recomana que sigui el doble.
5. Extreure un 10-15 ml de sang cada 10 dies després de la tercera immunització en un tub de plàstic
6. Després de la quarta extracció es fa una immunització de record
7. Als 15 dies es sacrifica l'animal i es recull la sang en tubs vacutainers
8. Separació del sèrum
9. Deixar coagular la sang 2 hores a temperatura ambient i després tota la nit a 4°C
10. Centrifugar a 2500 rpm durant 15 min a 4°C
11. Recuperar el sobrenedant. Aliquotar-lo i congelar-lo a -80°C. Identificar cada sèrum amb el numero de l'animal i el numero d'extracció
12. Controlar el títol d'anticossos de cada extracció per western contra diferents quantitats d'antigen sobreexpressat i d'extractes cel·lulars per detectar-ne l'endogen

### Purificació d'anticossos per cromatografia d'afinitat

Materials:

Columna amb l'antigen immobilitzat realitzada pel Servei de Síntesi de Pèptids de la Universitat de Barcelona.

PBS fred.

PBS/Azida (PBS amb 0,5% Azida Sòdica) filtrat.

Tampó Glicina (50 mM glicina, pH 2,3) filtrat.

Tampó Neutralitzador (1 M Tris-HCl, pH 8,0) filtrat.

Membrana de diàlisi Spectra/por, Spectrum.

Glicerol 100%.

Protocol (tot el procés i els reactius a 4°C):

1. Rentar la columna per gravetat amb 40 ml de PBS
2. Passar tres cops per la columna el sèrum diluït en PBS 1:1
3. Rentar la columna amb 40 ml de PBS
4. Eluir amb tampó Glicina. Recollir 10 fraccions de 500 µl en un eppendorf amb tampó Neutralitzador (determinar la quantitat de tampó necessari per neutralitzar els 500 µl, aproximadament 40 µl). Valorar el pH amb una tira de pH per acabar d'ajustar el de les fraccions
5. Passar 20 ml de tampó Glicina
6. Rentar la columna amb 20 ml de PBS i després 20 ml PBS/Azida com a conservant. Guardar a 4°C
7. Valorar la proteïna de les fraccions per Bradford
8. Ajuntar i dialitzar les fraccions amb la concentració més alta de proteïna en front d'1 litre de PBS durant 2 hores a 4°C en agitació. Canviar el tampó per dos litres de PBS nou i deixar tota la nit
9. Valorar la proteïna de la mostra dialitzada
10. Afegir glicerol al 20% final
11. Aliquotar i congelar a -80°C

## **Immunoprecipitació en condicions no reductores**

Material:

Cèl·lules HuH7, LNCaP i PC-3

Material de transfecció amb PEI

PBS1X

Tampó de RIPA

Anticòs contra la proteïna d'interès

Tampó de mostra 2X de proteïna sense DTT

Proteïna A Sepharosa (Amersham-Pharmacia)

Proteïna G Sepharosa (Amersham-Pharmacia)

Protocol (per plaques de 100 mm):

1. Preparar plats de cèl·lules HuH7 per tal que el dia següent estiguin a un 50-70% de confluència per transfectar-hi la construcció tPFK-2-pcDNA3 amb PEI i deixar 48 hores
2. Preparar plats de cèl·lules LNCaP i PC-3 per tal que el dia de realitzar el protocol estiguin al 90-100% de confluència
3. Rentar les cèl·lules 2 cops amb PBS 1X
4. Recuperar les cèl·lules en 1 ml de tampó de lisi-RIPA amb scrapers

5. Lisar les cèl·lules vortexant
6. Centrifugar a 14000 rpm durant 15 min a 4°C
7. Afegir als sobrenedants la quantitat d'anticòs desitjada (1/35 per l'anticòs anti-tPFK-2 purificat). Incubar 2 hores a 4°C en agitació per inversió
8. Centrifugar a 14000 rpm durant 5 min a 4°C
9. Afegir als sobrenedants 35 µl de Proteïna A i 35 µl de Proteïna G, incubar 1 hora a 4°C en agitació per inversió
10. Centrifugar a 14000 rpm durant 30 segons a 4°C
11. Rentar el precipitat 4 cops amb tampó RIPA sense inhibidors de proteases ni de fosfatases
12. Centrifugar a 14000 rpm durant 30 segons a 4°C
13. Resuspendre el precipitat amb tampó de mostra 2x per proteïnes, però sense DTT ni β-mercaptoetanol. Pipetejar repetides vegades suaument
14. Carregar les mostres en un gel desnaturalitzant de poliacrilamida al 10% sense bullir-les
15. Analitzar la immunoprecipitació per Western blot

SOLUCIONS :

<b>Tampó RIPA</b>
50 mM Tris-HCl, pH7.4
100 mM NaCl
1% Tritón X-100
5 mM EDTA
1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
40 mM β-glicerofosfat

---

## **7.- BIBLIOGRAFIA**

---

*Cuando se lee no se aprende algo, sino que se convierte uno en alguien.  
(Goet)*





**A**

- Albarracin, J. L., Fernandez-Novell, J. M., Ballester, J., Rauch, M. C., Quintero-Moreno, A., Pena, A., Mogas, T., Rigau, T., Yanez, A., Guinovart, J. J., et al. (2004a). Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of in vitro capacitation of dog spermatozoa in a medium without glucose. *Biol Reprod* 71, 1437-1445.
- Albarracin, J. L., Mogas, T., Palomo, M. J., Pena, A., Rigau, T., and Rodriguez-Gil, J. E. (2004b). In vitro capacitation and acrosome reaction of dog spermatozoa can be feasibly attained in a defined medium without glucose. *Reprod Domest Anim* 39, 129-135.
- Allard, E. K., Blanchard, K. T., and Boekelheide, K. (1996). Exogenous stem cell factor (SCF) compensates for altered endogenous SCF expression in 2,5-hexanedione-induced testicular atrophy in rats. *Biol Reprod* 55, 185-193.
- Amati, B. (2004). Myc degradation: dancing with ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8843-8844.
- Angulo, C., Rauch, M. C., Droppelmann, A., Reyes, A. M., Slebe, J. C., Delgado-Lopez, F., Guaiquil, V. H., Vera, J. C., and Concha, I. (1998). Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J Cell Biochem* 71, 189-203.
- Aquila, S., Sisci, D., Gentile, M., Middea, E., Siciliano, L., and Ando, S. (2002). Human ejaculated spermatozoa contain active P450 aromatase. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3385-3390.
- Atsumi, T., Chesney, J., Metz, C., Leng, L., Donnelly, S., Makita, Z., Mitchell, R., and Bucala, R. (2002). High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Res* 62, 5881-5887.

**B**

- Bajpai, M., Gupta, G., and Setty, B. S. (1998). Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. *Eur J Endocrinol* 138, 322-327.
- Ballester, J., Fernandez-Novell, J. M., Rutllant, J., Garcia-Rocha, M., Jesus Palomo, M., Mogas, T., Pena, A., Rigau, T., Guinovart, J. J., and Rodriguez-Gil, J. E. (2000). Evidence for a functional glycogen metabolism in mature mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 56, 207-219.
- Bando, H., Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Mishima, S., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R., and Koike, T. (2005). Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res* 11, 5784-5792.
- Bartrons, R., and Caro, J. (2007). Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr* 39, 223-229.
- Basciani, S., Mariani, S., Arizzi, M., Ulisse, S., Rucci, N., Jannini, E. A., Della Rocca, C., Manicone, A., Carani, C., Spera, G., and Gnassi, L. (2002). Expression of platelet-derived growth factor-A (PDGF-A), PDGF-B, and PDGF receptor-alpha and -beta during human testicular development and disease. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2310-2319.
- Bellve, A. R., Cavicchia, J. C., Millette, C. F., O'Brien, D. A., Bhatnagar, Y. M., and Dym, M. (1977a). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol* 74, 68-85.
- Bellve, A. R., Millette, C. F., Bhatnagar, Y. M., and O'Brien, D. A. (1977b). Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. *J Histochem Cytochem* 25, 480-494.
- 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.
- Bluthmann, H., Cicurel, L., Kuntz, G. W., Haedenkamp, G., and Illmensee, K. (1982). Immunohistochemical localization of mouse testis-specific phosphoglycerate kinase (PGK-2) by monoclonal antibodies. *Embo J* 1, 479-484.
- Bobarykina, A. Y., Minchenko, D. O., Opentanova, I. L., Moenner, M., Caro, J., Esumi, H., and Minchenko, O. H. (2006). Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers. *Acta Biochim Pol* 53, 789-799.
- Boccabella, A. V., Hovde, C. A., Soskind, L., and Harman, P. J. (1964). Influence of Hormones on Recovery of Electrical Activity of Crushed Sciatic Nerves in Hypophysectomized Rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 117, 800-803.
- Boer, P. H., Adra, C. N., Lau, Y. F., and McBurney, M. W. (1987). The testis-specific phosphoglycerate kinase gene pgk-2 is a recruited retroposon. *Mol Cell Biol* 7, 3107-3112.
- Bosl, G. J., and Motzer, R. J. (1997). Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med* 337, 242-253.
- Boussouar, F., and Benahmed, M. (2004). Lactate and energy metabolism in male germ cells. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 15.

- Boussouar, F., Mauduit, C., Tabone, E., Pellerin, L., Magistretti, P. J., and Benahmed, M. (2003). Developmental and hormonal regulation of the monocarboxylate transporter 2 (MCT2) expression in the mouse germ cells. *Biol Reprod* 69, 1069-1078.
- Broceno, C., Ruiz, P., Reina, M., Vilaro, S., and Pons, G. (1995). The muscle-specific phosphoglycerate mutase gene is specifically expressed in testis during spermatogenesis. *Eur J Biochem* 227, 629-635.
- Buehr, M., and McLaren, A. (1981). An electrophoretically detectable modification of glucosephosphate isomerase in mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* 63, 169-173.
- Bunch, D. O., Welch, J. E., Magyar, P. L., Eddy, E. M., and O'Brien, D. A. (1998). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* 58, 834-841.

### **C**

- Calvo, M. N., Bartrons, R., Castano, E., Perales, J. C., Navarro-Sabate, A., and Manzano, A. (2006). PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Lett* 580, 3308-3314.
- Carrera, A., Gerton, G. L., and Moss, S. B. (1994). The major fibrous sheath polypeptide of mouse sperm: structural and functional similarities to the A-kinase anchoring proteins. *Dev Biol* 165, 272-284.
- Chen, K., Knorr, C., Moser, G., Gatphayak, K., and Brenig, B. (2004). Molecular characterization of the porcine testis-specific phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) gene and its association with male fertility. *Mamm Genome* 15, 996-1006.
- Chesney, J. (2006). 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9, 535-539.
- Chesney, J., Mitchell, R., Benigni, F., Bacher, M., Spiegel, L., Al-Abed, Y., Han, J. H., Metz, C., and Bucala, R. (1999). An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3047-3052.
- Clermont, Y., and Morgentaler, H. (1955). Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. *Endocrinology* 57, 369-382.
- Cooke, J. E., Heasman, J., and Wylie, C. C. (1996). The role of interleukin-4 in the regulation of mouse primordial germ cell numbers. *Dev Biol* 174, 14-21.
- Cooper, T. G., Yeung, C. H., Nashan, D., and Nieschlag, E. (1988). Epididymal markers in human infertility. *J Androl* 9, 91-101.
- Cummins, E. P., and Taylor, C. T. (2005). Hypoxia-responsive transcription factors. *Eur J Physiology* 450, 363-371.

### **D**

- Dahl, H. H., Brown, R. M., Hutchison, W. M., Maragos, C., and Brown, G. K. (1990). A testis-specific form of the human pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit is coded for by an intronless gene on chromosome 4. *Genomics* 8, 225-232.
- Dang, C. V., and Semenza, G. L. (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in Biochemical Science* 24, 68.
- 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.
- Debes, J. D., and Tindall, D. J. (2002). The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Lett* 187, 1-7.
- Denis-Pouxviel, C., Gauthier, T., Daviaud, D., and Murat, J. C. (1990). Phosphofructokinase 2 and glycolysis in HT29 human colon adenocarcinoma cell line. Regulation by insulin and phorbol esters. *Biochemical Journal* 268, 465-470.
- Denolet, E., De Gendt, K., Allemeersch, J., Engelen, K., Marchal, K., Van Hummelen, P., Tan, K. A., Sharpe, R. M., Saunders, P. T., Swinnen, J. V., and Verhoeven, G. (2006). The effect of a sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor on testicular gene expression in prepubertal mice. *Mol Endocrinol* 20, 321-334.
- Depping, R., Hagele, S., Wagner, K. F., Wiesner, R. J., Camenisch, G., Wenger, R. H., and Katschinski, D. M. (2004). A dominant-negative isoform of hypoxia-inducible factor-1 alpha specifically expressed in human testis. *Biol Reprod* 71, 331-339.
- Devos, A., Claessens, F., Alen, P., Winderickx, J., Heyns, W., Rombauts, W., and Peeters, B. (1997). Identification of a functional androgen-response element in the exon 1-coding sequence of the cystatin-related protein gene *crp2*. *Mol Endocrinol* 11, 1033-1043.
- Dolci, S., Williams, D. E., Ernst, M. K., Resnick, J. L., Brannan, C. I., Lock, L. F., Lyman, S. D., Boswell, H. S., and Donovan, P. J. (1991). Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* 352, 809-811.
- Dufau, M. L., and Tsai-Morris, C. H. (2007). Gonadotropin-regulated testicular helicase (GRTH/DDX25): an essential regulator of spermatogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 18, 314-320.

- Duran, J., Gomez, M., Navarro-Sabate, A., Riera-Sans, L., Obach, M., Manzano, A., Perales, J. C., and Bartrons, R. (2008). Characterization of a new liver- and kidney-specific ptkfb3 isozyme that is downregulated by cell proliferation and dedifferentiation. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Dynan, W. S., and Tjian, R. (1983a). Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell* 32, 669-680.
- Dynan, W. S., and Tjian, R. (1983b). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35, 79-87.

## **E**

- Eble, J. N., Sauter, G., Epstein, J. I., and Sesterhenn, I. A. (2004). *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary Systems and Male Genital Organs*. (Lyon).
- Eddy, E. M. (1998). Regulation of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9, 451-457.
- Eddy, E. M. (2002). Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res* 57, 103-128.
- Eddy, E. M., Toshimori, K., and O'Brien, D. A. (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech* 61, 103-115.
- Edinger, A. L. (2007). Controlling cell growth and survival through regulated nutrient transporter expression. *Biochemical Journal* 406, 1-12.
- Edwards, Y. H., and Grootegoed, J. A. (1983). A sperm-specific enolase. *J Reprod Fertil* 68, 305-310.
- Encio, I. J., and Detera-Wadleigh, S. D. (1991). The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 266, 7182-7188.
- Erkkila, K., Aito, H., Aalto, K., Pentikainen, V., and Dunkel, L. (2002). Lactate inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *Mol Hum Reprod* 8, 109-117.
- Evans, R. M., and Hollenberg, S. M. (1988). Cooperative and positional independent trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 53 Pt 2, 813-818.

## **F**

- Fisher, C. R., Graves, K. H., Parlow, A. F., and Simpson, E. R. (1998). Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6965-6970.
- Frojdman, K., Harley, V. R., and Pelliniemi, L. J. (2000). Sox9 protein in rat sertoli cells is age and stage dependent. *Histochem Cell Biol* 113, 31-36.
- Fukasawa, M., Takayama, E., Shinomiya, N., Okumura, A., Rokutanda, M., Yamamoto, N., and Sakakibara, R. (2000). Identification of the promoter region of human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267, 703-708.
- Fukasawa, M., Tsuchiya, T., Takayama, E., Shinomiya, N., Uyeda, K., Sakakibara, R., and Seki, S. (2004). Identification and characterization of the hypoxia-responsive element of the human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *J Biochem* 136, 273-277.

## **G**

- Gao, P., Zhang, H., Dinavahi, R., Li, F., Xiang, Y., Raman, V., Bhujwalla, Z. M., Felsher, D. W., Cheng, L., Pevsner, J., et al. (2007). HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell* 12, 230-238.
- Gartel, A. L., and Shchors, K. (2003). Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* 283, 17-21.
- Gartel, A. L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., and Tyner, A. L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4510-4515.
- Gerber, H. P., Hagmann, M., Seipel, K., Georgiev, O., West, M. A., Litingtung, Y., Schaffner, W., and Corden, J. L. (1995). RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. *Nature* 374, 660-662.
- Ghosh, P. M., Malik, S. N., Bedolla, R. G., Wang, Y., Mikhailova, M., Prihoda, T. J., Troyer, D. A., and Kreisberg, J. I. (2005). Signal transduction pathways in androgen-dependent and -independent prostate cancer cell proliferation. *Endocrine-Related Cancer* 12, 119-134.

- Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z. H., and Tjian, R. (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 192-196.
- Gillis, B. A., and Tambllyn, T. M. (1984). Association of bovine sperm aldolase with sperm subcellular components. *Biol Reprod* 31, 25-35.
- Gnessi, L., Fabbri, A., and Spera, G. (1997). Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 18, 541-609.
- Goddard, I., Florin, A., Mauduit, C., Tabone, E., Contard, P., Bars, R., Chuzel, F., and Benahmed, M. (2003). Alteration of lactate production and transport in the adult rat testis exposed in utero to flutamide. *Mol Cell Endocrinol* 206, 137-146.
- Gold, B., Fujimoto, H., Kramer, J. M., Erickson, R. P., and Hecht, N. B. (1983a). Haploid accumulation and translational control of phosphoglycerate kinase-2 messenger RNA during mouse spermatogenesis. *Dev Biol* 98, 392-399.
- Gold, B., Stern, L., Bradley, F. M., and Hecht, N. B. (1983b). Gene expression during mammalian spermatogenesis. II. Evidence for stage-specific differences in mRNA populations. *J Exp Zool* 225, 123-134.
- Goldberg, E. (1990). Developmental expression of lactate dehydrogenase isozymes during spermatogenesis. *Prog Clin Biol Res* 344, 49-52.
- Gong, Y., Alkhalaf, B., Murphy, L. J., and Murphy, L. C. (1992a). Differential Effects of Phorbol Esters on Proliferation and Calcyclin Expression in Human Endometrial Carcinoma Cells. *Cell Growth and Differentiation* 3, 847-853.
- Gong, Y., Ballejo, G., Alkhalaf, B., Molnar, P., Murphy, L. C., and Murphy, L. J. (1992b). Phorbol esters differentially regulate the expression of insulin-like growth factor-binding proteins in endometrial carcinoma cells. *Endocrinology* 131, 2747-2754.
- Gordan, J. D., Bertout, J. A., Hu, C. J., Diehl, J. A., and Simon, M. C. (2007a). HIF-2 $\alpha$  promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* 11, 335-347.
- Gordan, J. D., Thompson, C. B., and Simon, C. (2007b). HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*, 109-113.
- Goren, N., Manzano, A., Riera, L., Ambrosio, S., Ventura, F., and Bartrons, R. (2000). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase expression in rat brain during development. *Brain Research Molecular Brain Research* 75, 138-142.
- Griswold, M. D. (1988). Protein secretions of Sertoli cells. *Int Rev Cytol* 110, 133-156.
- Griswold, M. D. (1995). Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod* 52, 211-216.
- Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9, 411-416.
- Grootegeod, J. A., Jansen, R., and Van der Molen, H. J. (1984). The role of glucose, pyruvate and lactate in ATP production by rat spermatocytes and spermatids. *Biochim Biophys Acta* 767, 248-256.
- Grootegeod, J. A., Jansen, R., and van der Molen, H. J. (1986). Effect of glucose on ATP dephosphorylation in rat spermatids. *J Reprod Fertil* 77, 99-107.

## **H**

- Hale, T. K., and Braithwaite, A. W. (1999). The adenovirus oncoprotein E1a stimulates binding of transcription factor ETF to transcriptionally activate the p53 gene. *J Biol Chem* 274, 23777-23786.
- Hamer, M. J., and Dickson, A. J. (1987). Developmental changes in hepatic fructose 2,6-bisphosphate content and phosphofructokinase-1 activity in the transition of chicks from embryonic to neonatal nutritional environment. *Biochemical Journal* 245, 35-39.
- Hamilton, J. A., Callaghan, M. J., Sutherland, R. L., and Watts, C. K. (1997). Identification of PRG1, a novel progesterin-responsive gene with sequence homology to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Molecular Endocrinology* 11, 490-502.
- Hammerman, P. S., Fox, C. J., and Thompson, C. B. (2004). Beginnings of a signal-transduction pathway for bioenergetic control of cell survival. *Trends Biochem Sci* 29, 586-592.
- Hecht, N. B. (1998). Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays* 20, 555-561.
- Hess, R. A. (1999). Spermatogenesis, Overview. *Encyclopedia of Reproduction* 4, 539-545.
- Hess, R. A., Bunick, D., and Bahr, J. (2001). Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract - a review. *Mol Cell Endocrinol* 178, 29-38.
- Hess, R. A., Cooke, P. S., Hofmann, M. C., and Murphy, K. M. (2006). Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell Cycle* 5, 1164-1170.

- Hirata, T., Watanabe, M., Miura, S., Ijichi, K., Fukasawa, M., and Sakakibara, R. (2000). Inhibition of tumor cell growth by a specific 6-phosphofructo-2-kinase inhibitor, N-bromoacetyethanolamine phosphate, and its analogues. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64, 2047-2052.
- Hirota, K., and Semenza, G. L. (2005). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 610-616.
- Hirota, K., and Semenza, G. L. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* 59, 15-26.
- Holdcraft, R. W., and Braun, R. E. (2004). Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 27, 335-342.
- Horwich, A., Shipley, J., and Huddart, R. (2006). Testicular germ-cell cancer. *Lancet* 367, 754-765.
- Hoshi, K., Tsukikawa, S., and Sato, A. (1991). Importance of Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> and glucose in the medium for sperm penetration through the human zona pellucida. *Tohoku J Exp Med* 165, 99-104.
- Huang, L. E. (2008). Carrot and stick: HIF- $\alpha$  engages c-Myc in hypoxic adaptation. *Cell Death and Differentiation*, 1-6.

**I**

- Illman, S. A., Keski-Oja, J., and Lohi, J. (2001). Promoter characterization of the human and mouse epilysin (MMP-28) genes. *Gene* 275, 185-194.
- Itman, C., and Loveland, K. L. (2008). SMAD expression in the testis: an insight into BMP regulation of spermatogenesis. *Dev Dyn* 237, 97-111.

**J**

- Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., and Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271, 17771-17778.
- Johnston, D. S., Russell, L. D., Friel, P. J., and Griswold, M. D. (2001). Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology* 142, 2405-2408.
- Jutte, N. H., Grootegoed, J. A., Rommerts, F. F., and van der Molen, H. J. (1981). Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J Reprod Fertil* 62, 399-405.
- Jutte, N. H., Jansen, R., Grootegoed, J. A., Rommerts, F. F., and van der Molen, H. J. (1983). FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. *J Reprod Fertil* 68, 219-226.

**K**

- Kageyama, R., Merlino, G. T., and Pastan, I. (1989). Nuclear factor ATF specifically stimulates transcription from promoters without a TATA box. *J Biol Chem* 264, 15508-15514.
- Kaluz, S., Kaluzova, M., and Stanbridge, E. J. (2003). Expression of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX is critically dependent on SP1 activity. Identification of a novel type of hypoxia-responsive enhancer. *Cancer Res* 63, 917-922.
- Kessler, R., Bleichert, F., Warnke, J. P., and Eschrich, K. (2008). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) is up-regulated in high-grade astrocytomas. *J Neurooncol* 86, 257-264.
- Kessler, R., and Eschrich, K. (2001). Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. *Brain Research Molecular Brain Research* 87, 190-195.
- Kim, J. W., Gao, P., Liu, Y. C., Semenza, G. L., and Dang, C. V. (2007). HIF-1 and dysregulated c-Myc cooperatively induces VEGF and metabolic switches, HK2 and PDK1. *Mol Cell Biol*.
- Kim, J. W., Zeller, K. I., Wang, Y., Jegga, A. G., Aronow, B. J., O'Donnell, K. A., and Dang, C. V. (2004). Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Mol Cell Biol* 24, 5923-5936.
- Kimmins, S., Kotaja, N., Fienga, G., Kolthur, U. S., Brancorsini, S., Hogeveen, K., Monaco, L., and Sassone-Corsi, P. (2004). A specific programme of gene transcription in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 8, 496-500.
- Kleene, K. C. (1996). Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol Reprod Dev* 43, 268-281.
- Kleene, K. C. (2001). A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech Dev* 106, 3-23.
- Kleene, K. C. (2003). Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenet Genome Res* 103, 217-224.
- Koji, T., Izumi, S., Tanno, M., Moriuchi, T., and Nakane, P. K. (1988). Localization in situ of c-myc mRNA and c-myc protein in adult mouse testis. *Histochem J* 20, 551-557.

- Koshiji, M., and Huang, L. E. (2004). Dynamic balancing of the dual nature of HIF-1alpha for cell survival. *Cell Cycle* 3, 853-854.
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E. A., Hiorikawa, I., Barret, J. C., and Huang, L. E. (2004). HIF-1a induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO Journal* 23, 1949-1956.
- Koshiji, M., To, K. K., Hammer, S., Kumamoto, K., Harris, A. L., Modrich, P., and Huang, L. E. (2005). HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpha expression. *Mol Cell* 17, 793-803.
- Kramer, J. M., and Erickson, R. P. (1981). Developmental program of PGK-1 and PGK-2 isozymes in spermatogenic cells of the mouse: specific activities and rates of synthesis. *Dev Biol* 87, 37-45.
- Krisfalusi, M., Miki, K., Magyar, P. L., and O'Brien, D. A. (2006). Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 75, 270-278.
- Krishnamurthy, H., Danilovich, N., Morales, C. R., and Sairam, M. R. (2000). Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) mouse. *Biol Reprod* 62, 1146-1159.

### **L**

- Lee, M., Bikram, M., Oh, S., Bull, D. A., and Kim, S. W. (2004a). Sp1-dependent regulation of the RTP801 promoter and its application to hypoxia-inducible VEGF plasmid for ischemic disease. *Pharm Res* 21, 736-741.
- Lee, M., Song, S. U., Ryu, J. K., and Suh, J. K. (2004b). Sp1-dependent regulation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter. *J Cell Biochem* 91, 1260-1268.
- Lee, T. L., Alba, D., Baxendale, V., Rennert, O. M., and Chan, W. Y. (2006). Application of transcriptional and biological network analyses in mouse germ-cell transcriptomes. *Genomics* 88, 18-33.
- Li, R., Knight, J. D., Jackson, S. P., Tjian, R., and Botchan, M. R. (1991). Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell* 65, 493-505.
- Li, S., Zhou, W., Doglio, L., and Goldberg, E. (1998). Transgenic mice demonstrate a testis-specific promoter for lactate dehydrogenase, LDHC. *J Biol Chem* 273, 31191-31194.
- Lu, H., Forbes, R. A., and Verma, A. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277, 23111-23115.
- Lubahn, D. B., Moyer, J. S., Golding, T. S., Couse, J. F., Korach, K. S., and Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11162-11166

### **M**

- Mabjeesh, N. J., Willard, M. T., Frederickson, C. E., Zhong, H., and Simons, J. W. (2003). Androgens stimulate hypoxia-inducible factor 1 activation via autocrine loop of tyrosine kinase receptor/phosphatidylinositol 3'-kinase/protein kinase B in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 9, 2416-2425.
- Maeda, T., Maeda, M., and Stewart, A. F. (2002). TEF-1 transcription factors regulate activity of the mouse mammary tumor virus LTR. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 1279-1285.
- Manzano, A. (1999) Conatge i seqüenciació d'isoenzims de fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa de teixits humans, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat.
- Manzano, A., Perez, J. X., Nadal, M., Estivill, X., Lange, A., and Bartrons, R. (1999). Cloning, expression and chromosomal localization of a human testis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Gene* 229, 83-89.
- Manzano, A., Rosa, J. L., Ventura, F., Perez, J. X., Nadal, M., Estivill, X., Ambrosio, S., Gil, J., and Bartrons, R. (1998). Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a ubiquitously expressed human 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphatase gene (PFKFB3). *Cytogenet Cell Genet* 83, 214-217.
- Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F., and Philipsen, S. (1997). Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89, 619-628.
- Marti, H. H., Katschinski, D. M., Wagner, K. F., Schaffer, L., Stier, B., and Wenger, R. H. (2002). Isoform-specific expression of hypoxia-inducible factor-1alpha during the late stages of mouse spermiogenesis. *Mol Endocrinol* 16, 234-243.
- Massagué, J., Seoane, J., and Wottem, D. (2006). Smad transcription factors. *Genes and Development* 19, 2783-2810.
- Mastrangelo, I. A., Courey, A. J., Wall, J. S., Jackson, S. P., and Hough, P. V. (1991). DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5670-5674.

- Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B. L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70, 841-847.
- Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001). The pVHL-hIF-1 system. A key mediator of oxygen homeostasis. *Adv Exp Med Biol* 502, 365-376.
- McCarrey, J. R., Kumari, M., Aivaliotis, M. J., Wang, Z., Zhang, P., Marshall, F., and Vandenberg, J. L. (1996). Analysis of the cDNA and encoded protein of the human testis-specific PGK-2 gene. *Dev Genet* 19, 321-332.
- McClard, R. W., Tsimikas, S., and Schriver, K. E. (1986). Inhibition of fructose bisphosphatase and stimulation of phosphofructokinase by a stable isosteric phosphonate analog of fructose 2,6-bisphosphate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 245, 282-286.
- McLachlan, R. I. (2000). The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14, 345-362.
- McLachlan, R. I., O'Donnell, L., Meachem, S. J., Stanton, P. G., de Kretser, D. M., Pratis, K., and Robertson, D. M. (2002). Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* 57, 149-179.
- Meng, J., Holdcraft, R. W., Shima, J. E., Griswold, M. D., and Braun, R. E. (2005). Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16696-16700.
- Meng, X., de Rooij, D. G., Westerdahl, K., Saarma, M., and Sariola, H. (2001). Promotion of seminomatous tumors by targeted overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse testis. *Cancer Res* 61, 3267-3271.
- Mertin, S., McDowall, S. G., and Harley, V. R. (1999). The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res* 27, 1359-1364.
- Mezquita, J., Pau, M., and Mezquita, C. (1998). Several novel transcripts of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expressed in adult chicken testis. *J Cell Biochem* 71, 127-139.
- Miki, K., Qu, W., Goulding, E. H., Willis, W. D., Bunch, D. O., Strader, L. F., Perreault, S. D., Eddy, E. M., and O'Brien, D. A. (2004a). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16501-16506.
- Miki, N., Ikuta, M., and Marsui, T. (2004b). Hypoxia-induced activation of the retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\alpha 4$  gene by an interaction between hypoxia-inducible factor-1 and Sp1. *JBiolChem* 279, 15025-15031.
- Millan, J. L., Driscoll, C. E., LeVan, K. M., and Goldberg, E. (1987). Epitopes of human testis-specific lactate dehydrogenase deduced from a cDNA sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5311-5315.
- Millette, C. F., and Bellve, A. R. (1977). Temporal expression of membrane antigens during mouse spermatogenesis. *J Cell Biol* 74, 86-97.
- Minchenko, A., Bauer, T., Salceda, S., and Caro, J. (1994a). Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 71, 374-379.
- Minchenko, A., Salceda, S., Bauer, T., and Caro, J. (1994b). Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene. *Cell Mol Biol Res* 40, 35-39.
- Minchenko, O., Opentanova, I., and Caro, J. (2003). Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett* 554, 264-270.
- Minchenko, O., Opentanova, I., Minchenko, D., Ogura, T., and Esumi, H. (2004). Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  activation. *FEBS Lett* 576, 14-20.
- Minchenko, O. H., Ochiai, A., Opentanova, I. L., Ogura, T., Minchenko, D. O., Caro, J., Komisarenko, S. V., and Esumi, H. (2005a). Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie* 87, 1005-1010.
- Minchenko, O. H., Ogura, T., Opentanova, I. L., Minchenko, D. O., and Esumi, H. (2005b). Splice isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4: expression and hypoxic regulation. *Mol Cell Biochem* 280, 227-234.
- Minchenko, O. H., Opentanova, I. L., Ogura, T., Minchenko, D. O., Komisarenko, S. V., Caro, J., and Esumi, H. (2005c). Expression and hypoxia-responsiveness of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 in mammary gland malignant cell lines. *Acta Biochim Pol* 52, 881-888.
- Mita, M., and Hall, P. F. (1982). Metabolism of round spermatids from rats: lactate as the preferred substrate. *Biol Reprod* 26, 445-455.
- Monsees, T. K., Franz, M., Gebhardt, S., Winterstein, U., Schill, W. B., and Hayatpour, J. (2000). Sertoli cells as a target for reproductive hazards. *Andrologia* 32, 239-246.

Mori, C., Nakamura, N., Welch, J. E., Gotoh, H., Goulding, E. H., Fujioka, M., and Eddy, E. M. (1998). Mouse spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase (mHk1-s) transcripts are expressed by alternative splicing from the mHk1 gene and the HK1-S protein is localized mainly in the sperm tail. *Mol Reprod Dev* 49, 374-385.

Mori, C., Welch, J. E., Sakai, Y., and Eddy, E. M. (1992). In situ localization of spermatogenic cell-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapd-s) messenger ribonucleic acid in mice. *Biol Reprod* 46, 859-868.

Mujica, A., Moreno-Rodriguez, R., Naciff, J., Neri, L., and Tash, J. S. (1991). Glucose regulation of guinea-pig sperm motility. *J Reprod Fertil* 92, 75-87.

## **N**

Nakamura, M., Fujiwara, A., Yasumasu, I., Okinaga, S., and Arai, K. (1982). Regulation of glucose metabolism by adenine nucleotides in round spermatids from rat testes. *J Biol Chem* 257, 13945-13950.

Nakamura, M., Hino, A., and Kato, J. (1981). Stimulation of protein synthesis in round spermatids from rat testes by lactate. II. Role of adenosine triphosphate (ATP). *J Biochem* 90, 933-940.

Nakamura, M., Okinaga, S., and Arai, K. (1984a). Metabolism of pachytene primary spermatocytes from rat testes: pyruvate maintenance of adenosine triphosphate level. *Biol Reprod* 30, 1187-1197.

Nakamura, M., Okinaga, S., and Arai, K. (1984b). Metabolism of round spermatids: evidence that lactate is preferred substrate. *Am J Physiol* 247, E234-242.

Nakamura, M., Okinaga, S., and Arai, K. (1986). Studies of metabolism of round spermatids: glucose as unfavorable substrate. *Biol Reprod* 35, 927-935.

Nakamura, N., Shibata, H., O'Brien, D. A., Mori, C., and Eddy, E. M. (2008). Spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase is the predominant hexokinase in sperm. *Mol Reprod Dev* 75, 632-640.

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

## **O**

Obach, M., Navarro-Sabate, A., Caro, J., Kong, X., Duran, J., Gomez, M., Perales, J. C., Ventura, F., Rosa, J. L., and Bartrons, R. (2004). 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem* 279, 53562-53570.

O'Donnell, L., Robertson, K. M., Jones, M. E., and Simpson, E. R. (2001). Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 22, 289-318.

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

O'Lone, R., Frith, M. C., Karlsson, E. K., and Hansen, U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Molecular Endocrinology* 18, 1859-1875.

Osthus, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonssey, D., Lee, L. A., and Dang, C. V. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *Journal of Biological Chemistry* 275, 21797.

## **P**

Palomo, M. J., Fernandez-Novell, J. M., Pena, A., Guinovart, J. J., Rigau, T., and Rodriguez-Gil, J. E. (2003). Glucose- and fructose-induced dog-sperm glycogen synthesis shows specific changes in the location of the sperm glycogen deposition. *Mol Reprod Dev* 64, 349-359.

Pang, A. L. Y., Johnson, W., Ravindranath, N., Dym, M., Rennert, O. M., and Chan, W.-Y. (2005). Expression profiling of purified male germ cells: stage-specific expression patterns related to meiosis and postmeiotic development. *Physiological Genomics* 24, 75-85.

Parisi, F., Wirapati, P., and Naef, F. (2007). Identifying synergistic regulation involving c-Myc and sp1 in human tissues. *Nucleic Acids Res* 35, 1098-1107.

Parvinen, M., Vihko, K. K., and Toppari, J. (1986). Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. *Int Rev Cytol* 104, 115-151.

Pentikainen, V., Erkkila, K., Suomalainen, L., Parvinen, M., and Dunkel, L. (2000). Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 85, 2057-2067.



- Persengiev, S. P., Raval, P. J., Rabinovitch, S., Millette, C. F., and Kilpatrick, D. L. (1996). Transcription factor Sp1 is expressed by three different developmentally regulated messenger ribonucleic acids in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* 137, 638-646.
- Petersen, C., and Söder, O. (2006). The Sertoli cell- a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone research* 66, 153-161.
- Philippe, B., Rousseau, G. G., and Hue, L. (1986). Fructose 2,6-bisphosphate and the control of glycolysis in bovine spermatozoa. *FEBS Lett* 200, 169-172.
- Pilkis, S. J., Claus, T. H., Kurland, I. J., and Lange, A. J. (1995). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu Rev Biochem* 64, 799-835.
- Pilkis, S. J., El-Maghrabi, M. R., Pilkis, J., Claus, T. H., and Cumming, D. A. (1981). Fructose-2,6-bisphosphate. a new activator of phosphofructokinase. *Journal of Biological Chemistry* 256, 3171.
- Pugh, B. F., and Tjian, R. (1990). Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 61, 1187-1197.

## **R**

- Regadera, J., Martinez-Garcia, F., Gonzalez-Peramato, P., Serrano, A., Nistal, M., and Suarez-Quian, C. (2001). Androgen receptor expression in sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 413-421.
- Reinke, V., Smith, H. E., Nance, J., Wang, J., Van Doren, C., Begley, R., Jones, S. J., Davis, E. B., Scherer, S., Ward, S., and Kim, S. K. (2000). A global profile of germline gene expression in *C. elegans*. *Mol Cell* 6, 605-616.
- Rider, M. H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P. A., Rousseau, G. G., and Hue, L. (2004). 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J* 381, 561-579.
- Riera, L. (2002) Regulació de la isoforma ubiqua de la 6-fosfofructoquinasa-2/fructosa-2,6-bisfosfatasa, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona).
- Riera, L., Manzano, A., Navarro-Sabate, A., Perales, J. C., and Bartrons, R. (2002). Insulin induces PFKFB3 gene expression in HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1589, 89-92.
- Riera, L., Obach, M., Navarro-Sabate, A., Duran, J., Perales, J. C., Vinals, F., Rosa, J. L., Ventura, F., and Bartrons, R. (2003). Regulation of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway during myogenic C2C12 cell differentiation. *FEBS Lett* 550, 23-29.
- Riera, M. F., Meroni, S. B., Gomez, G. E., Scheingart, H. F., Pellizzari, E. H., and Cigorraga, S. B. (2001). Regulation of lactate production by FSH, iL1beta, and TNFalpha in rat Sertoli cells. *Gen Comp Endocrinol* 122, 88-97.
- Robertson, K. M., O'Donnell, L., Jones, M. E., Meachem, S. J., Boon, W. C., Fisher, C. R., Graves, K. H., McLachlan, R. I., and Simpson, E. R. (1999). Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (*cyp 19*) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7986-7991.
- Robinson, R., and Fritz, I. B. (1981). Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biol Reprod* 24, 1032-1041.
- Rossi, P., Dolci, S., Sette, C., Capolunghi, F., Pellegrini, M., Loiarro, M., Di Agostino, S., Paronetto, M. P., Grimaldi, P., Merico, D., et al. (2004). Analysis of the gene expression profile of mouse male meiotic germ cells. *Gene Expr Patterns* 4, 267-281.
- Russell, D. L., and Kim, K. H. (1996). Expression of triosephosphate isomerase transcripts in rat testis: evidence for retinol regulation and a novel germ cell transcript. *Biol Reprod* 55, 11-18.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., SinhaHikim, A. P., and Clegg, E. D. (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis).
- Russell, L. D., Kershaw, M., Borg, K. E., El Shennawy, A., Rulli, S. S., Gates, R. J., and Calandra, R. S. (1998). Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: FSH maintenance of cellular viability during pubertal spermatogenesis. *J Androl* 19, 308-319; discussion 341-302.

## **S**

- Saffer, J. D., Jackson, S. P., and Annarella, M. B. (1991). Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol* 11, 2189-2199.
- Sakai, A., Kato, M., Fukasawa, M., Ishiguro, M., Furuya, E., and Sakakibara, R. (1996). Cloning of cDNA encoding for a novel isozyme of fructose 6-phosphate, 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase from human placenta. *J Biochem (Tokyo)* 119, 506-511.
- Sakai, I., Sharief, F. S., and Li, S. S. (1987). Molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA for sperm-specific lactate dehydrogenase-C from mouse. *Biochem J* 242, 619-622.

- Sakakibara, R., Kato, M., Okamura, N., Nakagawa, T., Komada, Y., Tominaga, N., Shimojo, M., and Fukasawa, M. (1997). Characterization of a human placental fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biochemistry* 122, 122-128.
- Sakata, J., Abe, Y., and Uyeda, K. (1991). Molecular cloning of the DNA and expression and characterization of rat testes fructose-6-phosphate,2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* 266, 15764-15770.
- Salceda, S., and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272, 22642-22647.
- Sanchez-Elsner, T., Ramirez, J. R., Sanz-Rodríguez, F., Varela, E., Bernabeu, C., and Botella, L. M. (2004). A cross-talk between hypoxia and TGF- $\beta$  orchestrates erythropoietin gene regulation through Sp1 and Smads. *J Mol Biol* 336, 9-24.
- Schaufele, F., West, B. L., and Reudelhuber, T. L. (1990). Overlapping Pit-1 and Sp1 binding sites are both essential to full rat growth hormone gene promoter activity despite mutually exclusive Pit-1 and Sp1 binding. *J Biol Chem* 265, 17189-17196.
- Schubert, C., Goltzsch, W., and Hofmann, E. (1983). Perinatal changes of fructose 2,6-bisphosphate in the rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 113, 672-677.
- Schurmann, A., Axer, H., Scheepers, A., Doege, H., and Joost, H. G. (2002). The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. *Cell Tissue Res* 307, 237-242.
- Seagroves, T. N., Ryan, H. E., Lu, H., Wouters, B. G., Knapp, M., Thibault, P., Laderoute, K., and Johnson, R. S. (2001). Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21, 3436-3444.
- Seipel, K., Georgiev, O., and Schaffner, W. (1992). Different activation domains stimulate transcription from remote ('enhancer') and proximal ('promoter') positions. *Embo J* 11, 4961-4968.
- Selva, D. M., Tirado, O. M., Toran, N., Suarez-Quian, C., Reventos, J., and Munell, F. (2000). Meiotic arrest and germ cell apoptosis in androgen-binding protein transgenic mice. *Endocrinology* 141, 1168-1178.
- Semenza, G. L. (2001a). HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 13, 167-171.
- Semenza, G. L. (2001b). HIF-1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 7, 345-350.
- Semenza, G. L. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology* 64, 993-998.
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.
- Semenza, G. L. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* 2007, cm8.
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P., and Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1 and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271, 32529-32537.
- Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M., and Wang, G. L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269, 23757-23763.
- Setchell, B. P., and Main, S. J. (1975). The blood - testis barrier and steroids. *Curr Top Mol Endocrinol* 2, 223-233.
- Sharpe, R. M., Kerr, J. B., McKinnell, C., and Millar, M. (1994). Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. *J Reprod Fertil* 101, 193-198.
- Shi, Q., Le, X., Abbruzzese, J. L., Peng, Z., Qian, C. N., Tang, H., Xiong, Q., Wang, B., Li, X. C., and Xie, K. (2001). Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 61, 4143-4154.
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C. S., Dang, G., Jungmann, R. A., Dalla-Favera, R., and Dang, C. V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6658-6663.
- Singh, J., O'Neill, C., and Handelsman, D. J. (1995). Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* 136, 5311-5321.
- Siu, M. K., and Cheng, C. Y. (2004). Extracellular matrix: recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Biol Reprod* 71, 375-391.
- Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Giannakis, D., and Pardalidis, N. (2008). Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Sols, A. (1981). Multimodulation of enzyme activity. *Curren Topics in Cellular Regulation* 19, 77.
- Storey, B. T., and Kayne, F. J. (1975). Energy metabolism of spermatozoa. V. The Embden-Myerhof pathway of glycolysis: activities of pathway enzymes in hypotonically treated rabbit epididymal spermatozoa. *Fertil Steril* 26, 1257-1265.

- Su, W., Jackson, S., Tjian, R., and Echols, H. (1991). DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1. *Genes Dev* 5, 820-826.
- Suarez-Quian, C. A., Martinez-Garcia, F., Nistal, M., and Regadera, J. (1999). Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 350-358.
- Suske, G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238, 291-300.

## I

- Tanaka, H., and Baba, T. (2005). Gene expression in spermiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 62, 344-354.
- Tanaka, H., Takahashi, T., Iguchi, N., Kitamura, K., Miyagawa, Y., Tsujimura, A., Matsumiya, K., Okuyama, A., and Nishimune, Y. (2004). Ketone bodies could support the motility but not the acrosome reaction of mouse sperm. *Int J Androl* 27, 172-177.
- Telang, S., Yalcin, A., Clem, A. L., Bucala, R., Lane, A. N., Eaton, J. W., and Chesney, J. (2006). Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene* 25, 7225-7234.
- Teng, C. S., and Vilagrasa, X. (1998). Biphasic c-Myc protein expression during gossypol-induced apoptosis in rat spermatocytes. *Contraception* 57, 117-123.
- Thomas, K., Sung, D. Y., Yang, J., Johnson, K., Thompson, W., Millette, C., McCarrey, J., Breitberg, A., Gibbs, R., and Walker, W. (2005). Identification, characterization, and functional analysis of sp1 transcript variants expressed in germ cells during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* 72, 898-907.
- Thomas, K., Wu, J., Sung, D. Y., Thompson, W., Powell, M., McCarrey, J., Gibbs, R., and Walker, W. (2007). SP1 transcription factors in male germ cell development and differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 270, 1-7.
- Thomas, K. H., Wilkie, T. M., Tomashefsky, P., Bellve, A. R., and Simon, M. I. (1989). Differential gene expression during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* 41, 729-739.
- To, K. K., Koshiji, M., Hammer, S., and Huang, L. E. (2005). Genetic instability: the dark side of the hypoxic response. *Cell Cycle* 4, 881-882.
- Travis, A. J., Foster, J. A., Rosenbaum, N. A., Visconti, P. E., Gerton, G. L., Kopf, G. S., and Moss, S. B. (1998). Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Mol Biol Cell* 9, 263-276.
- Travis, A. J., Jorgez, C. J., Merdiushev, T., Jones, B. H., Dess, D. M., Diaz-Cueto, L., Storey, B. T., Kopf, G. S., and Moss, S. B. (2001). Functional relationships between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. *J Biol Chem* 276, 7630-7636.

## U

- Umer, F., and Sakkas, D. (1996a). Glucose is not essential for the occurrence of sperm binding and zona pellucida-induced acrosome reaction in the mouse. *Int J Androl* 19, 91-96.
- Umer, F., and Sakkas, D. (1996b). Glucose participates in sperm-oocyte fusion in the mouse. *Biol Reprod* 55, 917-922.
- Umer, F., and Sakkas, D. (1999a). Characterization of glycolysis and pentose phosphate pathway activity during sperm entry into the mouse oocyte. *Biol Reprod* 60, 973-978.
- Umer, F., and Sakkas, D. (1999b). A possible role for the pentose phosphate pathway of spermatozoa in gamete fusion in the mouse. *Biol Reprod* 60, 733-739.
- Umer, F., and Sakkas, D. (2003). Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* 125, 17-26.
- Uyeda, K., Furuya, E., and Sherry, A. D. (1981). The structure of "activation factor" for phosphofructokinase. *Journal of Biological Chemistry* 256, 8679-8684.

## V

- Van Schaftingen, E., Hue, L., and Hers, H. G. (1980a). Control of fructose-6-phosphate/fructose-1,6-bisphosphate cycle in isolated hepatocytes by glucose and glucagon. Role of low-molecular-weight stimulator of phosphofructokinase. *Biochemical Journal* 192, 887.
- Van Schaftingen, E., Hue, L., and Hers, H. G. (1980b). Study of the fructose-6-phosphate/fructose-1,6-bisphosphate cycle in the liver in vivo. *Biochemical Journal* 192, 263.
- Van Schaftingen, E., Jett, M. F., Hue, L., and Hers, H. G. (1981). Control of liver 6-phosphofructo-2-kinase by fructose-2,6-bisphosphate and others effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 3483.

Vicini, E., Loiarro, M., Di Agostino, S., Corallini, S., Capolunghi, F., Carsetti, R., Chieffi, P., Geremia, R., Stefanini, M., and Sette, C. (2006). 17-beta-estradiol elicits genomic and non-genomic responses in mouse male germ cells. *J Cell Physiol* 206, 238-245.

Vidal, V. P., Chaboissier, M. C., de Rooij, D. G., and Schedl, A. (2001). Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 28, 216-217.

### **W**

Walker, W. H., and Cheng, J. (2005). FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130, 15-28.

Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer reregulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5510.

Wang, G. L., and Semenza, G. L. (1996). Molecular basis of hypoxia-induced erythropoietin expression. *Curr Opin Hematol* 3, 156-162.

Wanzel, M., Herold, S., and Eilers, M. (2003). Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol* 13, 146-150.

Warburg, O. (1930). *Metabolism of Tumours*. Arnold Contestable, London.

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

Weinbauer, G. F., and Nieschlag, E. (1993). [Endocrine and paracrine regulation of spermatogenesis: what is important for the physician?]. *Internist (Berl)* 34, 712-718.

Welch, J. E., Barbee, R. R., Magyar, P. L., Bunch, D. O., and O'Brien, D. A. (2006). Expression of the spermatogenic cell-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDS) in rat testis. *Mol Reprod Dev* 73, 1052-1060.

Welch, J. E., Brown, P. L., O'Brien, D. A., Magyar, P. L., Bunch, D. O., Mori, C., and Eddy, E. M. (2000). Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells. *J Androl* 21, 328-338.

Welch, J. E., Schatte, E. C., O'Brien, D. A., and Eddy, E. M. (1992). Expression of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene specific to mouse spermatogenic cells. *Biol Reprod* 46, 869-878.

Wenger, R. H., and Katschinski, D. M. (2005). The hypoxic testis and post-meiotic expression of PAS domain proteins. *Semin Cell Dev Biol* 16, 547-553.

Wenger, R. H., Stiehl, D. P., and Camenisch, G. (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Science's signal transduction knowledge environment* 306, 1-13.

Wilkerson, D. C., Wolfe, S. A., and Grimes, S. R. (2002a). H1t/GC-box and H1t/TE1 element are essential for promoter activity of the testis-specific histone H1t gene. *Biol Reprod* 67, 1157-1164.

Wilkerson, D. C., Wolfe, S. A., and Grimes, S. R. (2002b). Sp1 and Sp3 activate the testis-specific histone H1t promoter through the H1t/GC-box. *J Cell Biochem* 86, 716-725.

Williams, A. C., and Ford, W. C. (2001). The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *J Androl* 22, 680-695.

Williams, A. C., and Ford, W. C. (2004). Functional significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm. *Biol Reprod* 71, 1309-1316.

Wolfes, H., Kogawa, K., Millette, C. F., and Cooper, G. M. (1989). Specific expression of nuclear proto-oncogenes before entry into meiotic prophase of spermatogenesis. *Science* 245, 740-743.

### **X**

Xu, Q., Ji, Y. S., and Schmedtje, J. F., Jr. (2000). Sp1 increases expression of cyclooxygenase-2 in hypoxic vascular endothelium. Implications for the mechanisms of aortic aneurysm and heart failure. *J Biol Chem* 275, 24583-24589.

### **Y**

Yanez, A. J., Bustamante, X., Bertinat, R., Werner, E., Rauch, M. C., Concha, II, Reyes, J. G., and Slebe, J. C. (2007). Expression of key substrate cycle enzymes in rat spermatogenic cells: fructose 1,6 bisphosphatase and 6 phosphofructose 1-kinase. *J Cell Physiol* 212, 807-816.

Yang, J., and Thomas, K. (1997). Molecular and functional characterization of the promoter region of the mouse LDH/C gene: enhancer-assisted, Sp-1-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acid Research* 25, 2213-2220.

**Z**

- Zabludoff, S. D., Charron, M., DeCerbo, J. N., Simukova, N., and Wright, W. W. (2001). Male germ cells regulate transcription of the cathepsin I gene by rat Sertoli cells. *Endocrinology* 142, 2318-2327.
- 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.
- Zhao, C., and Meng, A. (2005). Sp1-like transcription factors are regulators of embryonic development in vertebrates. *Development Growth Differ* 47, 201-211.



---

## 8. - PUBLICACIONES

---

*Mi unicornio azul,  
ayer se me perdió,  
no sé si se me fue,  
no sé si se extravió,  
y yo no tengo más  
que un unicornio azul.*

*(Mi unicornio azul, Silvio Rodríguez)*

