



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio del papel que juegan los niveles de O-GlcNAcilación de proteínas en el desarrollo del fenotipo maligno usando como modelo el cáncer de colon

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Gabriela Fuentes García

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Martha Robles Flores  
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Leticia Rocha Zavaleta  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Marina Macías Silva  
Instituto de Fisiología, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Mayo, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas  
Tesis Digitales  
Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©  
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Fuentes García Gabriela**  
**Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas**  
**P r e s e n t e**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día **22 de noviembre** del presente año, revisaron su solicitud de **RATIFICACIÓN de JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctorado en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Estudio del papel que juegan los niveles de O GlicNAcilación de proteínas en el desarrollo del fenotipo maligno usando como modelo el cáncer de colon.**", dirigida por la Dra. **Robles Flores Martha**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Aguilar Arnal Lorena
VOCAL	Zenteno Galindo Edgar
VOCAL	Martínez Dunker Iván
VOCAL	García Becerra Rocío Ángeles
SECRETARIO	Camacho Arroyo Ignacio

**A LOS MIEMBROS DEL JURADO:**

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene **30 días hábiles** para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
**Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 22 de noviembre de 2021**  
**Coordinadora**



**Dra. Claudia Lydiá Treviño Santa Cruz**

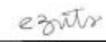
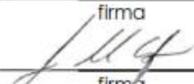
**SINODALES DESIGNADOS**

**Presente**

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **22 de noviembre** del presente año, conocieron la solicitud de **RATIFICACIÓN** de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctorado en Ciencias** de la estudiante **Fuentes García Gabriela** con la tesis **"Estudio del papel que juegan los niveles de O GicNAclación de proteínas en el desarrollo del fenotipo maligno usando como modelo el cáncer de colon."**, dirigida por la Dra. **Robles Flores Martha**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

		Acepto			
PRESIDENTE	Aguilar Arnal Lorena	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	<u>03/12/2021</u>	
				fecha	firma
VOCAL	Zenteno Galindo Edgar	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	<u>03/12/2021</u>	
				fecha	firma
VOCAL	Martínez Dunker Iván	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	<u>03/12/2021</u>	
				fecha	firma
VOCAL	García Becerra Rocío Ángeles	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	<u>06/12/2021</u>	
				fecha	firma
SECRETARIO	Camacho Arroyo Ignacio	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	<u>09/12/21</u>	
				fecha	firma

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
 Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 22 de noviembre de 2021  
 Coordinadora



**Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**



El proyecto fue apoyado por (DGAPA-UNAM (IN215514 y IN225717) y por CONACYT (FOSSIS 2017-289600). Durante mis estudios de doctorado gocé de una beca CONACyT. Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para realizar la estancia en el extranjero a la Université de Lille, France: bajo la dirección del Dr. Tony Lefebvre.

El jurado del examen estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Lorena Aguilar Arnal	IIB, UNAM
Vocal	Dr. Edgar Zenteno Galindo	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Iván Martínez Duncker	Centro de Investigación en Dinámica celular, UAEM
Vocal	Dra. Rocío Ángeles García Becerra	IIB, UNAM
Secretario	Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres por todo el apoyo, todas las palabras y los consejos que me brindaron para concluir mis estudios de posgrado. A mi mamá por estar pendiente de mi situación emocional, por todas las palabras de ánimo y estar presente en mis etapas más difíciles. A mi papá por alentarme a estudiar una carrera en ciencias, por acompañarme durante mi licenciatura y confiar en mí para desarrollarme como una persona independiente. A ambos por darme todas las bases para la vida.

A mi esposo Daniel García Yáñez, quien no dejó de apoyarme durante toda la pandemia de COVID19. Por acompañarme y ayudarme a superar la depresión que me afectó durante el último año. Por alentarme, cuidarme y no dejar que desistiera. Definitivamente eres mi persona.

Agradezco a mi familia por estar ahí para mí y por todas sus palabras de apoyo: a mi hermano, mi cuñada, mi tío Paco, mi tía Vero, mis tías, tíos y primos.

A la Doctora Martha Robles Flores, por aceptarme en su laboratorio a pesar de que tuviera poco tiempo para concluir mi doctorado.

A la Doctora Cristina Castañeda Patlán, quien me apoyó en todos los ámbitos tanto técnicos con todos los experimentos en el laboratorio, como emocionales. Agradezco infinitamente toda su ayuda, palabras de aliento y sobre todo su amistad.

Al Doctor Tony Lefebvre, quien me aceptó en su laboratorio para realizar la estancia en la Universidad de Lille, todas sus palabras, su confianza y por hacerme sentir como en casa durante mi estadía en Lille.

A la Doctora Blanca Haydé Ruiz Ordaz, quien fue mi asesora durante gran parte de mis estudios de posgrado. Le agradezco por formarme y despertar la curiosidad científica en mí; por enseñarme a ser analítica, crítica y propositiva. Por enseñarme que el método no es tan importante como el desarrollo de la investigación.

A la Licenciada Dafne Peña Vera, quien fue mi maestra, mi roomie y mi amiga durante gran parte de mis estudios de posgrado. Gracias porque ahora que estoy de regreso me siento como en casa, siento que volví con mi familia Mana'olana. Gracias, por tanto, no acabaría de enlistar todo lo que hemos pasado en tantos años.

A la Maestra Jessica Mateos Rodríguez, quien siempre me dio palabras de aliento y me salvó de la quiebra, también por todo lo que vivimos durante nuestro paso por PPD. Gracias por tanto Jess.

A la Licenciada Julieta García y a PPD, que me brindaron apoyo para poder finalizar los experimentos pendientes para la publicación de mi artículo.

A todas las chicas de Mana'olana que es mi segundo hogar desde que me mudé a CDMX; en especial a Isabel, a Luis, a la madrina y a Irma.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio que hicieron amena mi estancia durante mis estudios de posgrado: a Jess, Janet, Adriana, Hugo, Eduardo, Marco y Gaby.

A mis amigos exPPDianos: a Alonso, Úrsula, AnaGaby, Arturo, David, Nathalie, Marisol, Eréndira; gracias por todos los aprendizajes, los consejos y las aventuras que vivimos.

A todas las personas que de manera directa o indirecta me enseñaron algo durante este largo camino a mi titulación de doctorado.

A mis hijas peludas: Lia, Candy y Kraken (aka, Pichi). Quienes me han enseñado que cada ser te ama a su manera.

A mí, porque no desistí a pesar de todas las adversidades que durante todos estos años se presentaron. Porque me aferré a mi objetivo de titulación y lo logré. So proud of myself.

**“La salud mental es también parte del bienestar del ser humano; no basta con solo cuidar la salud física para ser una persona plenamente saludable”**

## CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>xviii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xx</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Sellos distintivos del cáncer	4
1.1.2 Reprogramación del metabolismo energético	5
1.1.3 Vías metabólicas involucradas en sensor el estado nutricional celular	10
1.1.3.1 Vías AMPK y mTOR	11
1.2. Vía HBP: generación de O-GlcNAc	14
1.2.1 O-GlcNAcilación en señalización celular y en estrés celular	21
1.2.2 O-GlcNAc y su papel en cáncer	24
1.2.3 O-GlcNAc y su papel en la troncalidad	35
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>42</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>42</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>43</b>
<b>5. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>43</b>
<b>6. METODOLOGÍA</b>	<b>44</b>
6.1 Reactivos y anticuerpos	44
6.2 Líneas celulares	44
6.3 Cultivos celulares	45
6.4 Western Blotting	45
6.5 Microscopía confocal e Inmunofluorescencia	46
6.6 Citometría de flujo	47
6.7 Aislamiento celular por FACS	48
6.8 Inhibidores farmacológicos	48

6.9 Apoptosis	49
6.10 Ensayos de proliferación	49
6.11 Ensayo de formación de colonias	50
6.12 Cultivos 3D	50
6.13 Análisis estadístico	50
<b>7. RESULTADOS</b>	
7.1 Los perfiles de expresión de los marcadores de troncalidad celular en las células cancerosas colorrectales cambian durante la progresión del cáncer	51
7.2 Las líneas celulares de CRC tienen un incremento en los niveles de O-GlcNAcilación en comparación con las células de colon no maligna y la perturbación de estos niveles incrementa la expresión de marcadores de troncalidad	54
7.3 Las subpoblaciones doble positivas CD44+/CD133+, inducidas como resultado de la inhibición de OGT, poseen un fenotipo más agresivo evaluado mediante el incremento en la clonogenicidad y la formación de esferoides en cultivos 3D	61
7.4 El estrés nutricional induce efectos similares a los observados durante la inhibición de OGT en la expresión de marcadores de troncalidad en células cancerosas	65
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>68</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>74</b>
<b>10. ARTÍCULOS PUBLICADOS DERIVADOS DE ESTA TESIS</b>	<b>75</b>
<b>11. ARTÍCULOS ADICIONALES PUBLICADOS DURANTE LOS ESTUDIOS DE POSGRADO</b>	<b>105</b>
<b>12. REFERENCIAS</b>	<b>106</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de los tipos más frecuentes de cáncer según la WHO. GLOBOCAN 2018.

Tabla 2. Lista de los tipos de cáncer con los rangos de mortalidad más altos según la WHO. GLOBOCAN

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Rangos estandarizados de edad de la incidencia (A) y la mortalidad (B) en cáncer para 5 continentes de acuerdo a la agencia internacional de investigación de la WHO.

**Figura 2.** Sellos distintivos del cáncer

**Figura 3.** Representación esquemática de las diferencias entre la fosforilación oxidativa, la glucólisis anaeróbica y la glucólisis aeróbica (Efecto Warburg).

**Figura 4.** El flujo de nutrientes a través de la vía HBP regula la O-GlcNAcilación

**Figura 5.** Representación esquemática de las isoformas de OGT y OGA

**Figura 6.** La O-GlcNAcilación modifica la maquinaria transcripcional

**Figura 7.** O-GlcNAc y los sellos distintivos del cáncer

**Figura 8.** Regulación de factores de transcripción por O-GlcNAc

**Figura 9.** Modelo en el que se muestra el papel de O-GlcNAc en el mantenimiento de la troncalidad

**Figura 10.** Expresión de CD133, CD44 y CD44v6 en líneas celulares normal y cancerosas de origen colorrectal

**Figura 11.** Los niveles de O-GlcNAcilación y la expresión de OGT son mayores en las líneas cancerosas en comparación con la línea normal de colon mientras que la expresión de OGA se ve disminuida en las líneas malignas en comparación con las no-malignas

**Figura 12.** Efectos de la inhibición de OGT y OGA en los rangos de proliferación y apoptosis de las células SW480 y SW620

**Figura 13.** La inhibición de OGT promueve cambios en la expresión de los marcadores de troncalidad, CD133 y CD44

**Figura 14.** Las subpoblaciones troncales CD44+/CD133+ doble positivas inducidas como el resultado de la inhibición de OGT muestran un fenotipo más agresivo en comparación con las subpoblaciones que solo expresan 1 marcador

**Figura 15.** El estrés nutricional mimetiza los efectos de la inhibición de OGT en la expresión de marcadores de troncalidad

## ABREVIATURAS

Abreviaturas	Inglés	Español
°C	Celsius Grades	Grados Centígrados
µg	micrograms	Microgramos
µM	micromolar	Micromolar
5mC	5-methylcytosine	5-metilcitosina
Acetil-CoA	Acetil Co-enzima A	Acetil Co-enzima A
Akt	Protein kinase B, PKB	Proteína Cinasa B
AMP	Adenosine Monophosphate	Adenosin-Monofosfato
AMPK	Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase	Proteína Cinasa Activada por Adenosin-Monofosfato
APC	Adenomatous Polyposis Coli	
APC	Allophycocyanin	Alofococianina
ATCC	American Type Culture Collection	Colección Americana de Tipos Celulares
ATP	Adenosine tri-phosphate	Adenosina tri-fosfato
Bmi-1	B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1	Sitio 1 de integración
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	Homólogo B1 al oncogen viral de sarcoma murino v-raf
BSA	Bovine Serum Albumin	Albúmina Sérica Bovina
CARM	coactivator-associated arginine methyltransferase 1	Co-Activador Asociado a la Metiltransferasa de Arginina
CD	Cluster of differentiation	Grupo de diferenciación
CFSE	Carboxy Fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester	Éster Carboxi Fluoresceina Diacetato Succinimidilo
CK	Casein Kinase	Cinasa de Caseína
CO <sub>2</sub>	Carbon Dioxide	Dióxido de Carbono
CRC	Colorectal Cancer	Cáncer Colorrectal
CSC	Cancer Stem Cells	Células Troncales Cancerosas
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimetil Sulfóxido
DNA	Desoxyribonucleic Acid	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	Ácido Etilnediaminotetracético
EGF	Epidermal Growth Factor	Factor de Crecimiento Epidérmico
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition	Transición Epitelio Mesénquima
ESC	Embryonic Stem Cells	Células Troncales Embrionarias
FACS	Fluoresce Activated Cell Sorter	Separador Celular Activado por Fluorescencia
FBS	Fetal Bovine Serum	Suero Fetal Bovino
FDG	Fluorodeoxyglucose	Fluorodesoxiglucosa
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor	Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FITC	Fluorescein Isotiocyanate	Fluoresceína Isotiocianato
FOX	Forkhead box	Caja Forkhead
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	Deshidrogenasa Gliceraldehído-3-fosfato
GFAT	Glutamina-Fructosa-6-Fosfato Amidotransferasa	Amidotransferasa Glutamina-Fructosa-6-Fosfato
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory	Observatorio Global de Cáncer
GLUT	Glucose Transporter	Transportador de Glucosa
GSH	Glutathione	Glutación
GSK	Glycogen Synthase Kinase	Glucógeno Sintasa Cinasa
HA	Hyaluronic acid	Ácido Hialurónico
HAT	Histone Acetyltransferase	Acetiltransferasa de Histonas

HBP	Hexosamine Biosynthetic Pathway	Vía Biosintética de las Hexosaminas
HBSS	Hanks' Balanced Salt solution	Solución Salina Balanceada de Hanks
HCF	Host cell factor	Factor Celular Hospedero
HDAC	Histone Deacetylase	Desacetilasa de Histonas
HIF	Hypoxia Inducible Transcription Factor	Factor de Transcripción Inducible por Hipoxia
HPV	Human Papilloma Virus	Virus del Papiloma Humano
HSC	Hematopoietic Stem Cells	Células Troncales Hematopoyéticas
I $\kappa$ B	Inhibitor of Nuclear factor $\kappa$ B	Inhibidor del Factor Nuclear $\kappa$ B
ITS	Insulin, Transferrin and Selenite grow supplement	Suplemento del crecimiento con Insulina, Transferrina y Selenito
JNK	Jun N-Terminal Kinase	Cinasa Jun N-Terminal
kDA	Kilo Daltons	Kilo Dalton
KLF	Krüppel-like factor	Factor similar a Krüppel
KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase	Protooncogen KRAS, GTPasa
Lgr	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor	Receptor acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en Leucina
LKB	Liver kinase	Cinasa Hepática
LSD	Lysine-specific histone demethylase	Desmetilasa de histonas específicas de Lisina
MDM	Murine Double Minute	Doble Minuto Murino
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor cells	Células Supresoras derivadas de mieloides
mg	Milligram	Miligramo
MGEA5	Meningioma Expressed antigen 5	Antígeno 5 expresado por Meningioma
min	minute	Minuto
ml	milliliter	Mililitro
MLL	Mixed Lineage leukemia	Leucemia de Linaje Mixto

mM	millimolar	Milimolar
MMP	Matrix metallopeptidase	Metalopeptidasa de Matriz
MTS	Mitochondrial Targeting Sequence	Secuencia Blanco Mitochondrial
MSL	Male-Specific Lethal	Letal Específico Masculino
MSC	Mesenchymal Stem Cells	Células Troncales Mesenquimales
mESC	Mouse Embryonic Stem Cells	Células Troncales Embrionarias Murinas
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin	Blanco de Rapamicina en mamíferos
mTORC	Mammalian Target of Rapamycin Complex	Complejo Blanco de Rapamicina en mamíferos
Myc	Myelocytomatosis Retrovirus Homolog	Homólogo del Retrovirus de Mielocitomatosis
N	Nitrogen	Nitrógeno
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	Dinucleótido Adenina Nicotinamida
NFκB	Nuclear factor-κB	Factor Nuclear κB
ng	Nanogram	Nanogramo
NSL	Nonspecific Lethal	Letal no específico
O	Oxigen	Oxígeno
O-GlcNAc	O-linked-N-acetylglucosamine	N-Acetilglucosamina unida a Oxígeno
OCT	Octamer-Binding Transcription factor	Factor de Transcripción de unión a Octámero
OGA	O-GlcNAcase	O-GlcNAcase
OGT	O-GlcNAc Transferase	O-GlcNAc Transferasa
OXPHOS	Oxidative Phosphorylation	Fosforilación Oxidativa
PARP	Poly adenosine Diphosphate-Ribose Polymerase	Polimerasa Poli Adenosina Difosfato Ribosa
PBS	Phosphate-Buffered Saline	Amortiguador de fosfatos Salino
PE	phycoerythrin	Ficoeritrina
PET	Positron Emission Tomography	Tomografía de Emisión de Positrones

PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	Fosfoinositido-3 Cinasa
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PKC	Protein kinase C	Proteína Cinasa C
PKM	Pyruvate Kinase M	Piruvato Cinasa M
PPO	Phosphoinositide-Binding	Unión fosfoinositido
PPP	Pentose Phosphate Pathway	Vía de las Pentosas Fosfato
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog	Homólogo de Fosfatasa y Tensina
PTM	Posttranslational Modification	Modificación postraduccional
RAS	Rat Sarcoma Virus	Virus de Sarcoma de Rata
RB	Retinoblastoma-associated	Asociado a Retinoblastoma
RTK	Receptor Tyrosine Kinases	Receptores Tirosina Cinasas
RNA	Ribonucleic acid	Ácido Ribonucleico
ROS	Reactive Oxygen Species	Especies Reactivas de Oxígeno
rpm	Revolutions per minute	Revoluciones por Minuto
RT	Room Temperature	Temperatura Ambiente
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio
SEM	Standard Error Mean	Media del error estándar
Ser	Serine	Serina
SIRT	Sirtuin	Sirtuina
SOX	SRY-Box Transcription Factor	Factor de Transcripción de la caja SRY
STK	Serine/threonine Protein Kinase	Proteína Cinasa de Serina/treonina
TCA	Citric Acid Cycle	Ciclo del ácido cítrico
TET	Ten-Eleven Translocation	Translocación diez-once
TGF	Transforming Growth Factor	Factor de Crecimiento Transformante
Thr	Threonine	Treonina
Topo	Topoisomerase	Topoisomerasa

TPR	Tetratricopeptide Repeats	Repeticiones tetratricopeptídicas
UDP-GlcNAc	Uridine-Di phosphate-N-Acetylglucosamine	Uridina-Difosfato-N-acetilglucosamina
UTP	Uridine-Triphosphate	Uridina trifosfato
UV	Ultra Violet	Ultravioleta
VHL	von Hippel-Lindau	
WB	Western Blot	
WHO	World Health Organization	Organización Mundial de la Salud
Wnt	wingless/int1	
YAP	Yes-associated protein	Proteína Asociada a Yes

## RESUMEN

La modificación post-traducciona O-GlcNAc (por sus siglas en inglés O-linked-N-acetylglucosamine; N-Acetilglucosamina unida a Oxígeno) de proteínas ha emergido como un regulador clave de diversos procesos celulares incluyendo a los sellos distintivos del cáncer. Sin embargo, la función que tiene esta modificación en el establecimiento del fenotipo tronca canceroso ha descrita de forma limitada. En este estudio se confirmó que las células cancerosas de colon muestran niveles basales de O-GlcNAc más elevados en comparación con las células no malignas, como ya había sido reportado anteriormente. También se investigó el rol que desempeña la O-GlcNAc en la regulación del fenotipo de células troncales cancerosas. Se encontró que la modificación de los niveles de O-GlcNAc, a través de la inhibición farmacológica de las enzimas que adicionan (OGT) o remueven (OGA) esta modificación en las Ser y Thr de sus proteínas blanco, cambia la expresión de marcadores de troncalidad: la inhibición de OGT, la cual adiciona esta modificación, pero no de la de OGA, incrementó la expresión de los marcadores e indujo la aparición de una pequeña subpoblación (correspondiente al 1-10%) con características de células troncales dobles positivas para los marcadores CD133+ y CD44+; las cuales, exhibieron un fenotipo maligno más agresivo, evaluado mediante el incremento en la clonogenicidad y la formación de esferoides en cultivos 3D. Dado que la O-GlcNAc es un sensor nutricional, se hipotetizó que la inhibición de OGT podría mimetizar la presencia de estrés nutricional en el tumor. Consistente con esto, encontramos que el estrés nutricional reprodujo los efectos obtenidos de la inhibición de OGT en las células cancerosas de colon. Por lo que

los datos presentados sugieren que el fenotipo troncal es regulado por la vía de señalización sensora de nutrientes denominada vía de Biosíntesis de Hexosaminas (HBP/O-GlcNAcilación), y que el sensor nutricional O-GlcNAc representa un mecanismo de supervivencia importante en las células cancerosas bajo condiciones de estrés nutricional.

## **ABSTRACT**

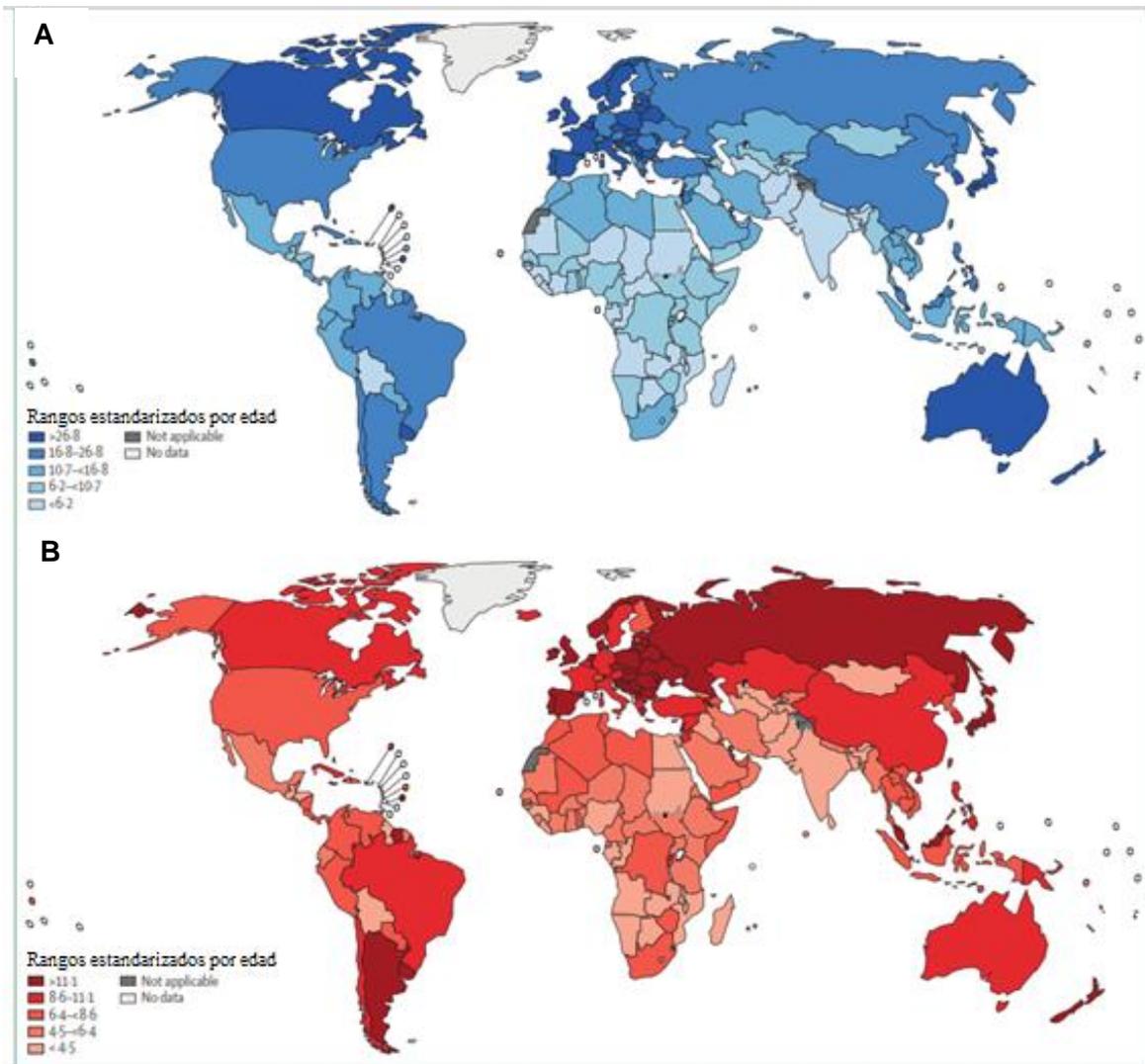
The posttranslational protein modification O-GlcNAc (O-linked-N-acetylglucosamine) has emerged as a key regulator in several cellular processes, including the hallmarks of cancer. However, the role played by this modification in the establishment of the cancer stem phenotype has been poorly studied and remains to be elucidated. In this work, it was confirmed that cancer colon cells showed higher basal levels of O-GlcNAcylation compared to no malignant cells, as previously reported, and it was examined the role of O-GlcNAcylation in the regulation of Cancer Stem Cells. It was found that the modification of O-GlcNAc levels through pharmacological inhibition of the enzymes that add (OGT) or remove (OGA) O-GlcNAc from serine and threonine from target proteins modified the expression of stem cell markers: inhibition of OGT; which adds O-GlcNAc, increase the expression of stem cell markers and induced the presence of a small subpopulation (corresponding to 1-10% of the total population) with stem cell characteristics expressing both markers CD133 and CD44 (double-positive subpopulation), that exhibited a more aggressive malignant phenotype, evaluated by the increased of clonogenicity ability and spheroid formation in 3D cell cultures. Since O-GlcNAcylation is a nutritional sensor, it was hypothesized that the inhibition of OGT could mimic the presence of nutritional stress in the tumor. Consistently, it was found that nutritional stress reproduced the obtained effects of OGT inhibition in cancer colon cells. Therefore, the data in this work suggests that stem phenotype is regulated by nutrient sensing pathway HBP and that nutritional sensor O-GlcNAc represents an important survival mechanism in the cancer cells under nutritional stress.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer constituye un problema de salud con gran impacto humano y económico. La mortalidad por cáncer ha aumentado sostenidamente en los últimos 25 años a nivel mundial. Su incidencia y mortalidad aumentan con la edad, lo que asociado al envejecimiento poblacional incrementará la demanda de recursos humanos y materiales, con aumento de los costos asociados a diagnóstico, tratamiento, seguimiento y rehabilitación de los pacientes. La lista de los tipos de cáncer más frecuentes de acuerdo con GLOBOCAN se encuentra en la Tabla 1 mientras que la distribución a nivel mundial se muestra en la Figura 1A.

Tabla 1. Lista de los tipos más frecuentes de cáncer según la WHO. GLOBOCAN 2018.

Tipo de cáncer	Incidencia (Millones)				Riesgo-74 años (%)		
	Total	Hombres	Mujeres	Ratio	Total	Hombres	Mujeres
<b>Todos</b>	18.079	9.456	8.623	1.1	20.2	22.41	18.25
<b>Pulmón</b>	2.094	1.369	0.725	1.89	2.75	3.8	1.77
<b>Mama</b>	2.088	-	2.088	-	-	-	5.03
<b>Próstata</b>	1.276	1.276	-	-	-	3.73	-
<b>Colon</b>	1.097	0.576	0.521	1.11	1.31	1.51	1.12
<b>Estómago</b>	1.034	0.684	0.35	1.95	1.31	1.87	0.79
<b>Hígado</b>	0.841	0.597	0.245	2.44	1.08	1.61	0.57
<b>Recto</b>	0.704	0.43	0.274	1.57	0.91	1.2	0.65
<b>Esófago</b>	0.572	0.4	0.172	2.32	0.78	1.15	0.43
<b>Cérvix</b>	0.57	-	0.57	0.3	-	-	1.36
<b>Tiroides</b>	0.567	0.131	0.436	3	0.68	0.33	1.03
<b>Vejiga</b>	0.549	0.424	0.125	38	0.65	1.08	0.27
<b>Linfoma (no Hodgkins)</b>	0.51	0.285	0.225	1.27	0.61	0.72	0.51
<b>Páncreas</b>	0.459	0.243	0.216	1.13	0.55	0.65	0.45
<b>Leucemia</b>	0.437	0.249	0.188	1.33	0.48	0.57	0.4
<b>Riñón</b>	0.403	0.255	0.149	1.71	0.52	0.69	0.35



**Figura 1. Rangos estandarizados de edad de la incidencia (A) y la mortalidad (B) en cáncer para 5 continentes de acuerdo a la agencia internacional de investigación de la WHO.** Los rangos estandarizados de edad son la medida resumida de los rangos que una población tendría si tuviera una estructura de edad estándar. La estandarización es necesaria cuando se comparan diversas poblaciones que difieren con respecto a la edad, ya que la edad tiene una influencia importante en el riesgo de ser diagnosticado con o morir por cáncer.

Con respecto a la mortalidad, el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, con un reporte de 8.97 millones de muertes y se ha reportado un incremento del 28% durante 15 años. La lista de los tipos de cáncer con mayor mortalidad, de acuerdo a GLOBOCAN en el 2018, se muestra en la Tabla 2. La

posición en el rango de mortalidad no coincide completamente con el rango de frecuencia, ya que el rango de mortalidad (calculado como el radio de la frecuencia y la mortalidad) es mayor para ciertos tipos de cáncer que otros (Figura 1B) (Mattiuzzi and Lippi, 2019).

Tabla 2. Lista de los tipos de cáncer con los rangos de mortalidad más altos según la WHO. GLOBOCAN 2018.

Tipo de cáncer	Mortalidad (Millones)				Riesgo-74 años (%)			Rango de mortalidad (%)
	Total	Hombres	Mujeres	Radio	Total	Hombres	Mujeres	
<b>Todos</b>	9.555	5.386	4.169	1.29	10.63	12.71	8.7	53
<b>Pulmón</b>	1.761	1.185	0.576	2.06	2.22	3.19	1.32	84
<b>Hígado</b>	0.781	0.548	0.233	2.35	0.98	1.46	0.53	93
<b>Estómago</b>	0.783	0.513	0.269	1.91	0.95	1.36	0.57	76
<b>Mama</b>	0.627	-	0.627	-	-	-	1.41	30
<b>Colon</b>	0.551	0.29	0.261	1.11	0.54	0.66	0.44	50
<b>Esófago</b>	0.509	0.357	0.151	2.36	0.67	1	0.36	89
<b>Páncreas</b>	0.432	0.227	0.205	1.11	0.5	0.59	0.41	94
<b>Tiroides</b>	0.411	0.156	0.255	0.61	0.05	0.04	0.05	7
<b>Próstata</b>	0.359	0.359	-	-	-	0.6	-	28
<b>Cérvix</b>	0.311	-	0.311	-	-	-	77	55
<b>Recto</b>	0.31	0.184	0.126	1.46	0.35	0.46	0.26	44
<b>Leucemia</b>	0.309	0.18	0.129	1.39	0.33	0.4	0.26	71
<b>Linfoma (no Hodgkins)</b>	0.249	0.146	0.103	1.42	0.27	0.35	0.21	49
<b>Vejiga</b>	0.2	0.148	0.052	2.87	0.18	0.29	0.08	36
<b>Riñón</b>	0.175	0.114	0.061	1.86	0.2	0.28	0.12	43

## **1.1 Sellos distintivos del cáncer**

El proceso de la patogénesis del tumor puede ser entendido como la adquisición de diversas características en las células que les permitan convertirse en tumorigénicas y malignas. Estas características, mejor conocidas como los sellos distintivos del cáncer, comprenden diversas capacidades biológicas adquiridas que les confieren a las células ciertas ventajas, las cuales, de forma complementaria promueven la transformación de células fenotípicamente normales a células malignas; promoviendo la progresión explotando al tejido hospedero de donde se originan (Fouad and Aanei, 2017) Entre ellas se incluyen: la señalización de proliferación sostenida, evasión de los supresores tumorales, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, capacidad invasiva y metástasis, reprogramación del metabolismo energético, inflamación promovida por el tumor y evasión del sistema inmune. Además de las células cancerosas, el tumor contiene un gran repertorio de células reclutadas que contribuyen a la adquisición de los sellos al crear el microambiente tumoral (Figura 2). La adquisición de estos sellos distintivos es posible debido a dos características habilitadoras: la más destacada es el desarrollo de la inestabilidad genómica en las células cancerosas, la cual genera mutaciones aleatorias incluyendo rearrreglos cromosomales. La segunda característica implica al estado inflamatorio de las lesiones premalignas y malignas el cual es impulsado por las células del sistema inmune, algunas de las cuales promueven la progresión tumoral en distintas formas (Hanahan and Weinberg, 2011).

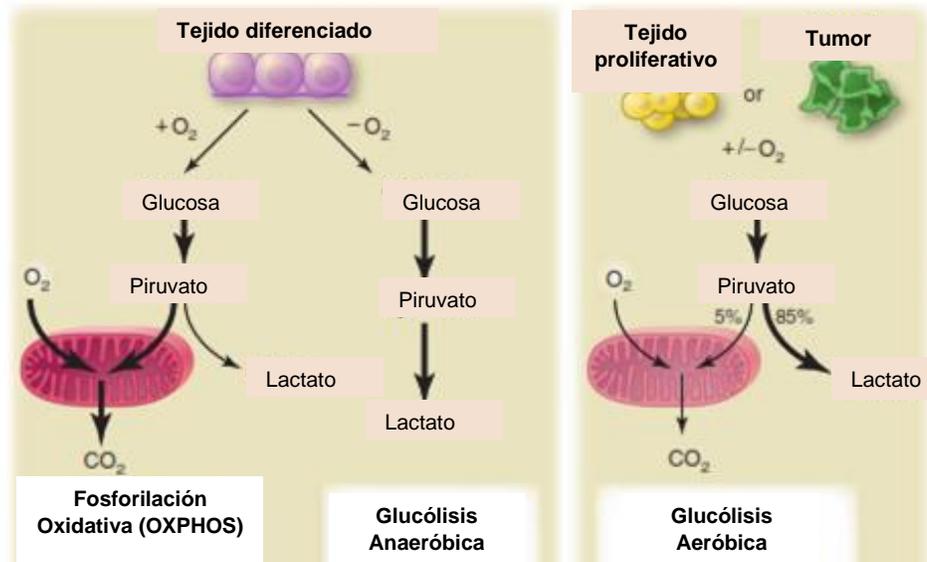


**Figura 2. Sellos distintivos del cáncer.** Cada sello del cáncer se representa con símbolos enmarcados en el círculo del panel. El dibujo en el centro del esquema representa el microambiente tumoral. Adaptado de Hanahan and Weinberg, 2011.

### 1.1.2 Reprogramación del metabolismo energético

La proliferación incontrolada y crónica que representa la esencia de la enfermedad neoplásica involucra no sólo el control desregulado de la proliferación celular sino también los ajustes del metabolismo energético correspondientes para sostener el crecimiento y la división celular. Bajo condiciones aeróbicas, las células normales procesan la glucosa, primero a piruvato a través de la glucólisis en el citosol y después hacia  $\text{CO}_2$  en la mitocondria. En condiciones anaeróbicas, la glucólisis es favorecida y se envía poco piruvato a la mitocondria. Otto Warburg fue el primero que observó una característica anómala en el metabolismo energético de la célula

cancerosa: independientemente de la presencia de oxígeno las células cancerosas pueden reprogramar su metabolismo y favorecer la producción energética hacia la glucólisis, llevando a un estado denominado “glucólisis aeróbica” (Figura 3) (Vander-Heiden et al., 2009).



**Figura 3. Representación esquemática de las diferencias entre la fosforilación oxidativa, la glucólisis anaeróbica y la glucólisis aeróbica (Efecto Warburg).** En presencia de oxígeno, los tejidos diferenciados que no proliferan, primero metabolizan la glucosa a piruvato a través de la glucólisis y después oxidan la mayoría del piruvato en la mitocondria a CO<sub>2</sub> durante la fosforilación oxidativa. Ya que se requiere oxígeno como aceptor final de electrones para completar la oxidación de la glucosa, el oxígeno es esencial para el proceso. Cuando el oxígeno es limitante, las células pueden redirigir el piruvato generado por la glucólisis para generar lactato (glucólisis anaeróbica). Esta producción de lactato durante la glucólisis anaeróbica permite que la glucólisis continúe (al ciclar NADH hacia NAD<sup>+</sup>) pero resulta en una producción mínima de ATP en comparación OXPHOS, Warburg observó que las células cancerosas tienden a convertir la mayoría de glucosa en lactato independiente de la presencia de oxígeno (Glucólisis aeróbica). Esta propiedad también se comparte con los tejidos normales en proliferación, aunque la glucólisis aeróbica es menos eficiente que la fosforilación oxidativa al generar ATP. Tomado de Vander Heiden et al., 2009.

Esta reprogramación energética podría parecer contradictoria, ya que la célula cancerosa debe compensar la eficiencia más baja de la producción de ATP de la glucólisis comparada con OXPHOS. Para eso, la célula regula de forma positiva transportadores de glucosa, como GLUT1, el cual incrementa la entrada de glucosa

al citoplasma (Jones and Thompson, 2009). De hecho, se reporta un marcado incremento en la incorporación y utilización de glucosa en muchos tipos de tumores humanos, lo que ha sido aplicado por décadas a través de la visualización no invasiva de la incorporación de glucosa usando FDG, un análogo radioactivo de glucosa, a través del monitoreo por PET (Cairns et al., 2011).

Se ha demostrado que la glucólisis está asociada con los oncogenes activados (como RAS y MYC) y los supresores de tumor como p53. Esta dependencia en glucólisis puede ser más acentuada bajo las condiciones hipóxicas que operan dentro de varios tumores: el sistema de respuesta a hipoxia actúa de manera pleiotrópica para regular de forma positiva los transportadores de glucosa y diversas enzimas de la vía de la glucólisis (Semenza, 2010a). Se ha reportado que RAS y la hipoxia dentro del tumor pueden incrementar de forma independiente los niveles de los factores de transcripción HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ , que a su vez regulan positivamente la glucólisis (Semenza, 2010b).

El incremento de la glucólisis permite la diversificación de los intermediarios glucolíticos a varias vías biosintéticas, incluyendo aquellas que generan nucleótidos y aminoácidos; facilitando la biosíntesis de macromoléculas y organelos requeridos para el ensamblaje de nuevas células (Vander Heiden et al., 2009). Mas aún, el efector Warburg en el metabolismo suele presentarse en muchos tejidos embrionarios de división rápida, sugiriendo un rol en el soporte a los programas biosintéticos de gran escala que son requeridos durante la proliferación activa.

En algunos tumores se ha encontrado la existencia de diferentes subpoblaciones de células cancerosas que difieren en las vías de obtención de energía. Una de ellas

presenta el efecto Warburg, depende de glucosa y secreta lactato; mientras que otra población importa y utiliza el lactato que producen las células vecinas como su mayor fuente de energía, utilizando el ciclo del ácido láctico (Semenza, 2008). Por ejemplo, dentro del tumor, el rango de oxigenación varía de normoxia a hipoxia y no es necesariamente estático, fluctúa de forma temporal y regional como resultado de la inestabilidad y la organización caótica de la neurovasculatura asociada al tumor (Hardee et al., 2009). Las células cancerosas hipóxicas dependen de glucosa como fuente de energía y secretan lactato como desecho, el cual es importado y usado como energía por las células mejor oxigenadas (aquellas que están cerca de los vasos sanguíneos). Muchos mecanismos y vías de señalización en las células cancerosas promueven el incremento en la ingesta de glucosa; por ejemplo, la expresión de HIF incrementa la expresión de GLUT y de la hexocinasa (captando a la glucosa entrante), mientras que la señalización aberrante de PI3K/AKT incrementa también la expresión de GLUT1 y su traslocación a la membrana celular, acción que también realizan los oncogenes KRAS y BRAF (Szablewski, 2013; Hay, 2016).

La reprogramación del metabolismo provee una ventaja selectiva durante la iniciación y progresión tumoral (Cairns and Mak, 2016). Sin embargo, no todo está enfocado a los cambios en la glucólisis, también existen otras alteraciones metabólicas en las células cancerosas: ingesta desregulada de glucosa y aminoácidos, formas oportunistas de adquisición de nutrientes, utilización de intermediarios de la glucólisis y del ciclo TCA, incremento de la demanda de

hidrógeno, alteraciones en la regulación genética dirigida por metabolitos e interacciones metabólicas con el microambiente (Pavlova and Thompson, 2016).

También se ha reportado un incremento en la ingesta de glutamina en las células cancerosas y se ha propuesto que esta molécula desempeña diversas funciones. Sin embargo, los reguladores de la ingesta de glutamina están menos caracterizados; se ha reportado que MYC promueve la expresión de los transportadores de glutamina y su utilización, mientras que RB puede regular de forma negativa la síntesis de glutamina. Las células tumorales pueden utilizar vías alternas además de los transportadores para adquirir la glutamina (y otros aminoácidos), por ejemplo, macropinocitosis de proteínas en periodos de privación de nutrientes, ingesta y digestión de células vivas o fagocitosis de productos apoptóticos de células vecinas. Por otro lado, la glutamina también es capturada por las mitocondrias y ser convertida en glutamato que puede ser utilizado directamente o también ser convertido en  $\alpha$ -cetoglutarato actuando como una alternativa a la glucosa para producir citrato o participar en la síntesis de ácidos grasos bajo condiciones no favorables (Altman et al., 2016). De hecho, las células cancerosas se caracterizan por un incremento dramático de la producción de lípidos, además de la sobreexpresión de los componentes principales de la síntesis de cadenas de ácidos grasos. Esto puede constituir una ventaja para las células tumorales en proliferación durante la formación de membranas lipídicas, así como alterando la composición de la membrana a través del porcentaje incrementado de ácidos grasos saturados resistentes al daño oxidativo (Röhrig and Schulze, 2016).

Como ya se mencionó anteriormente, los activadores centrales implicados en el fenotipo glucolítico es la vía PI3K/AKT/mTOR en conjunto con la señalización a través de MYC y HIF-1 (Duvel et al. 2010). Los supresores tumorales que suprimen esta vía, PTEN (García et al. 2004), VHL (Vanharanta et al. 2012), LKB1 (Esteller et al., 2000) y algunas hidroxilasas de prolina (Place et al., 2011) están silenciados epigenéticamente a través de la hipermetilación de los promotores, contribuyendo a la desregulación del metabolismo energético celular.

### **1.1.3 Vías metabólicas involucradas en la detección del estado nutricional celular**

Las vías de señalización más relevantes de supervivencia celular involucradas en sensor la disponibilidad de nutrientes son AMPK, mTOR y HBP. Estas vías constituyen sensores críticos de la energía celular y del estatus nutricional en células cancerosas e interaccionan entre sí en modos complejos y dinámicos.

La proliferación de las células malignas depende en gran medida del medioambiente nutricional que las rodea, particularmente de la disponibilidad de glucosa. El fenotipo metabólico de las CSCs ha sido el foco de extensos estudios en los últimos años. Es importante enfatizar que los tumores muestran heterogeneidad celular, aunque las CSCs prefieren la glucólisis y tienen menos mitocondrias, poseen una gran plasticidad metabólica que les permite adaptarse en condiciones de fluctuaciones medioambientales de nutrientes y estrés. Utilizando vías de señalización de detección de nutrientes tales como la HBP y las reguladas por mTOR y AMPK, las CSCs mantienen la producción de energía inhibiendo procesos esenciales tales como la OXPHOS y favoreciendo otras como la glucólisis. Debido

a lo anterior, se ha reportado que en estas células existe una tasa alta anormal de ingesta de glucosa y de glutamina de forma activa (Sancho et al, 2016).

La interacción entre estas vías de señalización ajusta la respuesta celular a la disponibilidad de nutrientes y es esencial para el mantenimiento del fenotipo troncal. Mantener un balance continuo entre la disponibilidad de nutrientes y la demanda energética es necesario para todas las células. En este balance mTOR actúa como molécula de señalización clave que regula el metabolismo de las células; mTOR opera a través de 2 complejos distintos mTORC1 y mTORC2. A su vez, al modular la expresión de GFAT1, mTORC2 controla HBP.

Por otro lado, la vía de mTOR regula de forma negativa a AMPK, el cual es un regulador esencial para el metabolismo celular. Esta enzima sincroniza procesos metabólicos para detectar y balancear la disponibilidad de nutrientes con el consumo de energía. También se ha reportado que los niveles celulares de O-GlcNAc controlan la actividad de AMPK; niveles altos de O-GlcNAc disminuyen la activación de AMPK, mientras que niveles bajos incrementan la activación. Por lo que la interacción entre las vías de HBP, mTOR y AMPK está involucrada en la detección de nutrientes para regular la actividad celular y el crecimiento, de forma muy importante, reaccionando a los cambios en el microambiente tumoral (Robles-Flores et al., 2021).

#### **1.1.3.1 Vías AMPK y mTOR**

Un sensor vital de la energía celular y del estado nutricional en las células eucariotas es AMPK. Además de sus roles canónicos para facilitar la supervivencia celular, AMPK juega un papel significativo al controlar la respiración mitocondrial, el

transporte de nutrientes, la autofagia, diferenciación, longevidad y polaridad celular. AMPK se activa en respuesta al estrés que resulta de la reducción en la producción de ATP (baja de glucosa, inanición, estrés oxidativo, hipoxia) o exceso en la ingesta de ATP (proliferación celular, contracción muscular, anabolismo). Al unirse de forma competitiva a ambas especies, AMPK detecta cambios en el ratio AMP/ATP, lo que resulta en su fosforilación mediante cinasas arriba de la vía y la regulación diferencial de muchos blancos río abajo que gobiernan vías anabólicas y catabólicas.

Las células cancerosas comúnmente están expuestas a hipoxia y reducción de nutrientes. La vía mTOR combina señales extrínsecas e intracelulares para controlar procesos celulares como la proliferación, la supervivencia celular, el metabolismo, la organización del citoesqueleto y la autofagia. También funciona como un factor que detecta nutrientes, crecimiento y estrés en células normales y cancerosas. Además, la regulación apropiada de esta vía contribuye al equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación de células troncales (Meng et al., 2018). La desregulación de mTOR es muy común en diversos tipos de cáncer: se han reportado la amplificación y mutaciones en RTKs, mutaciones en PI3K o RAS, así como mutaciones de pérdida de función en reguladores negativos como PTEN, que en conjunto colaboran para activar constitutivamente a la señalización de PI3K/AKT acoplada con la señalización de mTOR. Adicionalmente, las condiciones de estrés como el metabolismo hiperactivo, la disfunción mitocondrial y la activación crónica de mTOR, forzan a las células cancerosas a adaptarse para sobrevivir. Ya que el crecimiento celular canceroso es dependiente de la demanda de ATP, como la

biosíntesis de lípidos, proteínas y nucleótidos, es probable que se beneficien de la activación de mTORC1 que promueve la biosíntesis contribuyendo a la proliferación anormal. Sin embargo, cabe resaltar, que la actividad de mTOR inhibe al oncogen AKT a través de circuitos de retroalimentación negativa. Por lo que, la activación persistente de mTORC1 promueve la inhibición de AKT induciendo apoptosis. Como resultado, las células cancerosas necesitan un balance en la actividad de mTORC1 para mantener los procesos biosintéticos y que AKT permanezca en su forma activa de manera simultánea (Heberle et al., 2015). Debido a lo anterior, las células cancerosas han desarrollado mecanismos de protección para evitar la inducción de muerte celular provocada por el estrés crónico. Algunos ejemplos de tales mecanismos son la reprogramación metabólica (efecto Warburg), el incremento en la ingesta de glucosa, la síntesis de proteínas antioxidantes, autofagia, inducción de angiogénesis y la formación de gránulos de estrés. Además, mTORC1 puede modular el metabolismo, la supervivencia celular, la autorrenovación y el mantenimiento de la troncalidad principalmente a través de la activación de la síntesis proteica de factores de transcripción que induce la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en esas funciones. Bajo señales mitogénicas y de disponibilidad de aminoácidos, mTORC1 controla el importe nuclear de GSK3, lo que a su vez media la degradación de c-MYC debido a sus funciones nucleares (Bautista et al., 2018).

La activación de AMPK es un mecanismo crucial que mantiene la supervivencia de las células tumorales ya que las células cancerosas están metabólicamente adaptadas para sobrevivir, particularmente bajo condiciones de estrés nutricional y

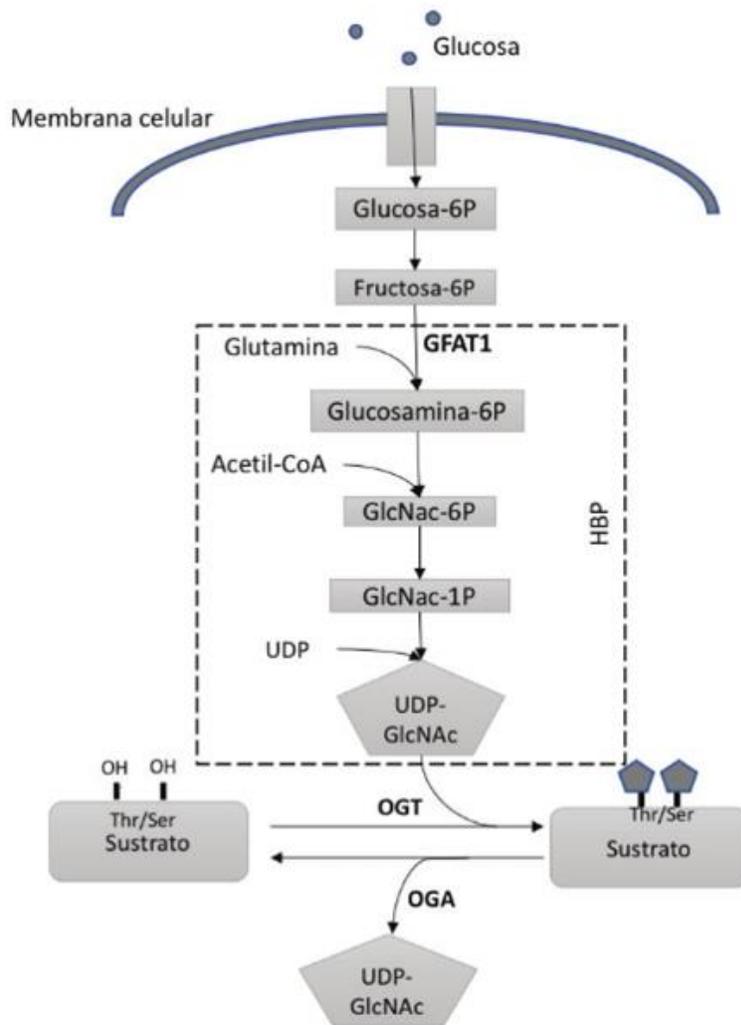
de energía. La activación de AMPK promueve la supervivencia y el crecimiento celular dentro de los tumores que experimentan reducción de sustratos catabólicos facilitando la transición de un metabolismo anabólico a uno catabólico al inhibir programas anabólicos, así como la señalización de mTORC1 (Torrence and Manning, 2018). Muchas aproximaciones génicas han demostrado que AMPK promueve la supervivencia, proliferación y migración celular mediante homeostasis redox en células malignas cooperando con oncogenes como c-MYC. Esta cooperación da como resultado un incremento en la transformación celular, la reprogramación metabólica, la regulación de la dinámica de microtúbulos y dando protección contra la quimioterapia y la radiación (Novikova et al., 2015).

## **1.2 Vía de Biosíntesis de Hexosaminas (HBP): Generación de O-GlcNAc**

Una vez que la glucosa entra a la célula y es fosforilada por la hexocinasa, puede ser redirigida desde las vías primarias glucolíticas a las vías secundarias: el flujo de la HBP aumenta y la glucosa también es metabolizada a través de otras vías alternativas como la vía PPP (Sancho et al., 2016). Se ha mostrado que la vía HBP tiene un rol esencial en la reprogramación metabólica del cáncer y existe una asociación fuerte entre la progresión tumoral y el flujo incrementado de esta vía. Se ha reportado una expresión elevada de las enzimas involucradas en HBP en muchos tipos de cáncer humanos. HBP es una vía metabólica que responde a nutrientes ya que incorpora glucosa intracelular, glutamina, acetil-CoA y UDP para sintetizar el producto final UDP-GlcNAc, por lo que esta vía proporciona información sobre la disponibilidad de nutrientes dentro de la célula. La enzima GFAT dirige a la glucosa a esta vía y representa la entrada a HBP (Chokchaitaweek et al., 2019).

El producto final de la HBP, el UDP-GlcNAc, es un donador de azúcar utilizado para la glicosilación de macromoléculas, la síntesis de otros nucleótidos y para una modificación proteica que en años recientes ha tomado importancia en diversos procesos celulares, la O-GlcNAcilación.

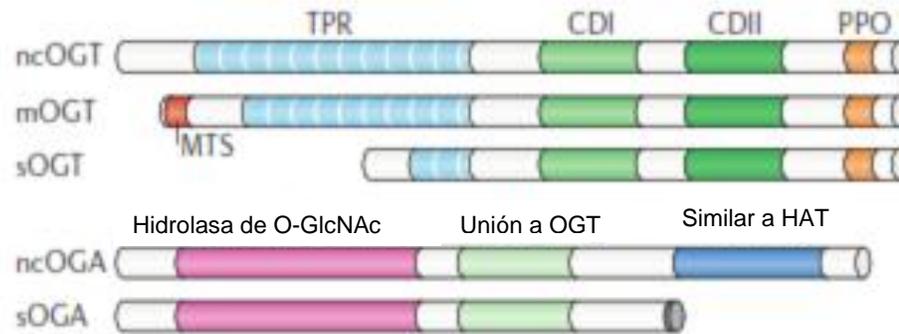
La O-GlcNAcilación es una PTM que consta de la unión entre el grupo hidroxilo de la Ser o Thr de proteínas citoplasmáticas, nucleares y mitocondriales y el UDP-GlcNAc a través de un enlace  $\beta$ -glucosídico, produciendo O-GlcNAc (Hart et al., 2011). Solo existen dos enzimas responsables de catalizar la adición y la remoción de O-GlcNAc: OGT, la cual cataliza la unión; y OGA, que cataliza la hidrólisis de la modificación (Hart et al., 2007) (Figura 4).



**Figura 4. El flujo de nutrientes a través de la vía HBP regula la O-GlcNAcilación.** La glucosa entra a la célula desde el medio extracelular por las proteínas GLUT. Mientras que la mayoría de la glucosa que ingresa a la célula se usa para la glucólisis y la síntesis de glucógeno, aproximadamente de 2-5% de la glucosa se destina a HBP. GFAT1 cataliza el paso limitante de HBP, el cual convierte a la fructosa-6-fosfato en glucosamina-6-fosfato. Una subsecuente acetilación y uridilación produce el sustrato para la O-GlcNAcilación, UDP-GlcNAc. OGT y OGA catalizan la adición y remoción de O-GlcNAc, respectivamente.

Debido al splicing alternativo y a los codones de inicio alternados, se pueden generar diversas isoformas de OGT y OGA a partir de los genes de OGT y MGEA5, respectivamente. Las 3 isoformas de OGT (nucleoplásmica, mitocondrial y corta) comparten dominios carboxilo terminal y de unión a fosfoinositido pero difieren en

su longitud debido al número variable de TPRs en su extremo amino terminal. Las 3 isoformas también difieren en su localización: la isoforma nucleoplásmica y corta se encuentra en el citoplasma y núcleo mientras que la mitocondrial es exclusiva de mitocondria. Por otro lado, se han reportado 2 isoformas de OGA: la nucleoplásmica, la cual posee un dominio N-terminal hidrolasa de O-GlcNAc y un dominio C-terminal similar a HAT; la isoforma corta, carece este dominio y se localiza principalmente en el retículo endoplásmico y las balsas lipídicas (Ruan et al., 2013) (Figura 5).



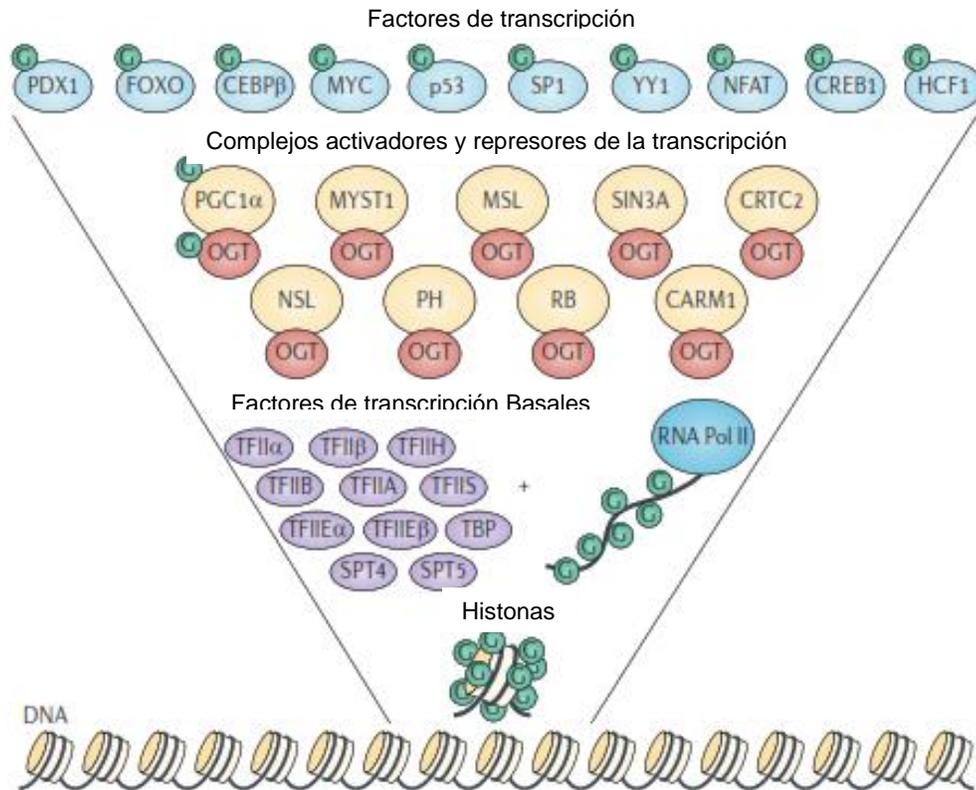
**Figura 5. Representación esquemática de las isoformas de OGT y OGA.** La isoforma nucleoplásmica (ncOGT), la isoforma mitocondrial (mOGT), y la isoforma corta (sOGT) de OGT difieren en su longitud debido a número variable de los TPRs en el amino-terminal pero comparten dominios CD (I y II) y PPO. mOGT contiene un MTS. Las isoformas ncOGA y sOGA tienen dominios idénticos de hidrolasa de O-GlcNAc en su extremo N-terminal y una región central de unión a OGT; sin embargo, la isoforma sOGA carece del dominio similar a HAT que está presente en ncOGA. Tomado de Yang and Qian, 2017.

Ya que la producción de O-GlcNAc requiere de diversos nutrientes derivados de otras vías metabólicas, se ha propuesto que la O-GlcNAcilación es un sensor metabólico y nutricional (Yang and Qian, 2017). Además de ser dependiente a la disponibilidad de nutrientes, O-GlcNAc es altamente sensible a diversas formas de estrés celular (por ejemplo, choque térmico, hipoxia y carencia de nutrientes).

También, evidencia creciente indica que interviene en la regulación de procesos celulares como la transcripción de genes, la traducción de proteínas, algunas vías de señalización, el metabolismo, la apoptosis; entre otros. A diferencia de las glucosilaciones canónicas, la glucosilación mediante O-GlcNAc es muy dinámica y frecuentemente es trascendente en respuesta a diversas señales ambientales y fisiológicas. Incluso, se ha reportado que interacciona con otras PTMs: ya que la fosforilación también tiene como blanco residuos de Ser y Thr, se ha mostrado que la O-GlcNAcilación puede ocurrir de forma recíproca o secuencial con la fosforilación en los mismos residuos o residuos cercanos de diversas proteínas (Hart et al., 2011). Muchos estudios han mostrado que la O-GlcNAcilación puede bloquear la degradación de proteínas al reducir su ubiquitinación, los mecanismos potenciales de esta inhibición incluyen el reclutamiento de deubiquitilasas a proteínas O-GlcNAcizadas y la modificación indirecta de la ubiquitinación mediante la comunicación cruzada con la fosforilación (Ruan et al., 2013). Más aún, ya que OGA posee tanto un dominio similar a HAT como un dominio de hidrolasa O-GlcNAc, se ha reportado que la O-GlcNAcilación de diversas proteínas potencia la acetilación (Allison et al., 2012). También se ha descrito que OGT puede regular la transcripción de las proteínas TET, las cuales son responsables de promover la desmetilación del DNA al hidrolizar 5mC, por lo que también existe una interacción entre la O-GlcNAcilación y la metilación del DNA contribuyendo a la regulación de la transcripción (Zhang et al., 2014).

Gracias al desarrollo de diversas tecnologías que han permitido identificar la O-GlcNAcilación de proteínas específicas, se ha descrito que el número de proteínas

modificadas en células humanas ha incrementado de algunos cientos a cerca de 4000, y la lista sigue en aumento (Ma and Hart, 2014). Entre las proteínas que son modificadas por O-GlcNAc, cerca del 25% de ellas son factores de transcripción o proteínas que están involucradas en la regulación de la expresión génica (Comer and Hart, 1999). La O-GlcNAcilación de estas proteínas puede determinar su localización subcelular, su interacción con otras proteínas, la fosforilación por proteína cinasas para determinar su actividad, o incluso su capacidad de unión a DNA en respuesta a ciertos estímulos fisiológicos (Ozcan et al., 2010). OGT también modifica a la maquinaria basal transcripcional incluyendo a la RNA polimerasa II y a diversos factores de transcripción por lo que probablemente tiene un papel fundamental en los sitios de transcripción (Figura 6).



**Figura 6. La O-GlcNAcilación modifica la maquinaria transcripcional.** Se muestran las proteínas reguladoras de la transcripción que son modificadas por O-GlcNAc, además de su papel catalítico, OGT interactúa con muchas proteínas reguladoras de la transcripción: las histonas son modificadas de forma dinámica por O-GlcNAc; también el dominio carboxilo terminal de RNA Pol II, así como múltiples factores basales de transcripción. Muchos complejos de activación y represión de la transcripción contienen enzimas que modifican histonas, como las metil-transferasas de histonas, las acetil-transferasas de histonas y las deacetilasas de histonas, las cuales también interaccionan con OGT, sugiriendo que OGT es una unidad integradora en la regulación del código de histonas. Finalmente, muchos factores de transcripción también son modificados por O-GlcNAc. Tomado de Slawson and Hart, 2011

Otros complejos regulatorios transcripcionales, como el represor SIN3A, NSL, MSL y CARM1 pueden asociarse con OGT y ser modificados. Asimismo, la O-GlcNAcilación activa el complejo de histonas metil-transferasas MLL5; este complejo metila a H3K4, lo cual conlleva a la activación transcripcional; sin embargo, solo cuando OGT está asociado con la proteína. Aproximadamente, el 50% de OGT en el núcleo existe en complejo con HCF1, por lo que OGT se ha relacionado con varias modificaciones en las histonas (Daou et al., 2011). A nivel nuclear, OGT

podría estar regulando programas epigenéticos de las histonas al modular su acetilación, ubiquitilación y metilación, pero la relación que existe entre las enzimas que modifican a las histonas y OGT, aún necesita ser dilucidada. Los datos anteriores sugieren que múltiples complejos que modifican a la cromatina pueden asociarse con OGT y que la O-GlcNAcilación de sus subunidades es crucial para su función apropiada (Slawson and Hart, 2011).

O-GlcNAc se ha relacionado con una variedad de funciones celulares como la señalización (Yang and Qiang, 2017), el metabolismo (Ferrer et al., 2014), la transcripción (Olivier-Van Stichelen and Hanover, 2015) y la progresión del ciclo celular (Tan et al., 2017). Por lo que la O-GlcNAcilación tiene un papel muy importante en diversas enfermedades humanas como la diabetes, los desórdenes degenerativos y el cáncer (Fuentes-García et al., 2021).

### **1.2.1 O-GlcNAcilación en señalización celular y en estrés celular**

La O-GlcNAcilación es un mecanismo crucial para que las células puedan responder a diversos estímulos. Esta modificación permite a la célula unir la disponibilidad de nutrientes y el metabolismo celular con la regulación de diversos procesos celulares como la regulación del ciclo celular, las respuestas a estrés y la expresión génica. Se ha descrito que la O-GlcNAcilación puede modular diversos procesos celulares en respuesta a nutrientes y a estrés celular (Kazemi et al., 2010). Las células inducen dinámicamente la modificación en respuesta a numerosas formas de estrés extracelular, y se ha postulado que puede ser una respuesta protectora para las células. Por ejemplo, elevar los niveles de O-GlcNAc por inhibición de OGA o por la

sobreexpresión de OGT brinda a las células mayor tolerancia a diferentes formas de estrés, como la exposición a luz UV, radiación, etanol y arsenito de sodio (Chatham and Marchase, 2010). Muchos de los factores de transcripción son O-GlcNAcizados en respuesta a diversos estímulos fisiológicos, de la etapa del ciclo celular y del desarrollo. Los motivos de O-GlcNAc en los factores de transcripción pueden ser reconocidos por diversos componentes de la maquinaria transcripcional, pueden funcionar como una señal de localización nuclear, ser antagonistas de proteínas cinasas al enmascarar los sitios de fosforilación en las Ser y Thr, modular la unión al DNA o la vida media de las proteínas e incrementar la estabilidad de los factores transcripcionales en la célula (Ozcan et al., 2010). Aunque la O-GlcNAcización se encuentra mayormente en proteínas nucleares, especialmente proteínas de unión al DNA; se ha descrito que otros tipos de proteínas también están modificadas por O-GlcNAc, entre ellas, algunas enzimas citosólicas, cinasas, enzimas glucolíticas, proteínas reguladoras de citoesqueleto, entre otras (Santoyo-Ramos et al., 2014).

El incremento del flujo de la vía HBP influye en diversas vías principales de señalización, por ejemplo, afecta la actividad y la translocación de ciertas isoformas de PKC, la cual desempeña papeles importantes en la proliferación, progresión del ciclo celular, diferenciación, tumorigénesis, apoptosis, remodelación del citoesqueleto, la modulación de los canales iónicos y la secreción (Matthews et al., 2005). Previamente en nuestro laboratorio, se encontró que diversas isoformas de PKC están modificadas postraduccionalmente por O-GlcNAc y que aparentemente estos motivos se encuentran en posiciones similares en todas las isoformas de PKC. Además, a pesar de que el porcentaje de identidad de secuencia varía entre las

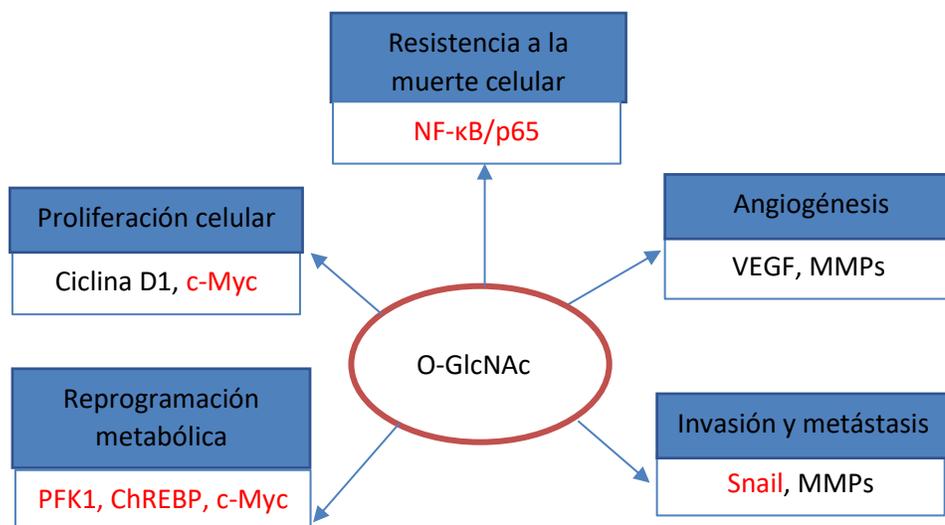
isoformas de PKC, los motivos de O-GlcNAc se encontraron en distintos péptidos con secuencias similares compartidas por diversas isozimas. De hecho, en las distintas isoformas el sitio de O-GlcNAcilación coincide con motivos importantes de autofosforilación, de activación, hidrofóbicos. Por lo tanto, se ha sugerido que en el caso de la vía de señalización de PKC, la O-GlcNAcilación y la fosforilación podrían modularse mutuamente (Robles-Flores et al., 2008).

La vía de señalización Wnt desempeña un papel importante en el desarrollo y la regulación de los sistemas de troncalidad en adultos. La desregulación de esta vía causa defectos en el desarrollo y cáncer. La vía canónica de Wnt opera mediante la regulación de la fosforilación y degradación del coactivador transcripcional  $\beta$ -catenina. Sin la estimulación de Wnt,  $\beta$ -catenina se ensambla en el llamado “complejo de destrucción”, en el cual APC tiene un rol central e incluye Axina, GSK3 $\beta$  y CK1. Este complejo dirige una serie de eventos de fosforilación en  $\beta$ -catenina que marca a la proteína para la ubiquitinación y proteólisis subsecuente a través del proteasoma. La estimulación de Wnt conlleva a la inhibición del corte proteolítico de  $\beta$ -catenina, permitiendo que se acumule, entre al núcleo y active los genes blancos de Wnt (Cadigan and Peifer, 2009). Sayet et al., demostró que la O-GlcNAcilación de  $\beta$ -catenina regula de forma negativa sus niveles en el núcleo, y también se observó una disminución en su actividad transcripcional. Mas aún, los resultados indicaron que la O-GlcNAcilación de  $\beta$ -catenina está relacionada inversamente con su localización nuclear y la función transcripcional (Sayat et al., 2008).

### **1.2.2 O-GlcNAc y su papel en cáncer**

Las células cancerosas se caracterizan por presentar un metabolismo basado en glucólisis y no en OXPHOS, como principal fuente de energía independiente de la presencia de oxígeno, fenómeno conocido como efecto Warburg. Este cambio en el metabolismo celular es impulsado por la hipoxia presente dentro del tumor y por mutaciones en oncogenes y supresores tumorales (DeBerardinis et al., 2008). Estas mutaciones promueven una regulación positiva de las enzimas glucolíticas y transportadores de glucosa, lo que a su vez incrementa la ingesta de glucosa en estas células (Osthus et al., 2000). La abundancia de glucosa en el citoplasma no solo contribuye al incremento de glucólisis, sino que también incrementa el flujo de algunas ramas de la vía, incluyendo la vía PPP y la de HBP. De hecho, ciertos oncogenes como KRAS regulan de forma positiva no solo los niveles de los transportadores de glucosa, sino también de otras enzimas como GFAT1, que es la enzima limitante en la vía HBP (Ying et al., 2012). Los oncogenes también regulan de forma positiva la ingesta de glutamina; por ejemplo, c-MYC promueve la expresión elevada de los transportadores de glutamina (Wise et al., 2008). La glutamina es el sustrato donador en la conversión de fructosa-6-fosfato a glucosamina-6-fosfato mediante GFAT en la vía HBP. Por lo que el incremento en la ingesta de glucosa debido al efecto Warburg, así como el incremento de la ingesta de glutamina, cooperan para provocar un incremento en el flujo de HBP, contribuyendo finalmente a un incremento en las concentraciones de UDP-GlcNAc, el sustrato donador de la OGT (Ma et al., 2013). Confirmando lo anterior, diversos autores han reportado niveles de O-GlcNAcilación aberrante con una tendencia al incremento, fenómeno conocido como hiper-O-GlcNAcilación en diferentes tipos de

cáncer: en cáncer de mama (Caldwell et al., 2010; Gu et al., 2010), de próstata (Lynch et al., 2012), de pulmón (Mi et al., 2011), CRC (Yehezkel et al., 2012), de hígado (Zhu et al., 2012), y en leucemia linfocítica crónica (Shi et al., 2010). También se ha descrito que la O-GlcNAcilación tiene un papel importante en la transformación y la carcinogénesis inducida por HPV (Zeng et al., 2016). Cabe recalcar que existe evidencia creciente que muestra una relación entre los niveles de O-GlcNAc y diversas características distintivas del cáncer, como angiogénesis y metástasis; además, muchos supresores tumorales y oncogenes conocidos por ser iniciadores clave del fenotipo maligno canceroso, están regulados por O-GlcNAc (p53, NFκB, c-Myc, HIF-1 y Akt) (Hanover et al., 2018). Por lo anterior, la O-GlcNAcilación está emergiendo como característica general de las células cancerosas y recientemente ha sido postulada como un sello distintivo del cáncer (Fardini et al., 2013). De igual forma, se ha postulado a OGT como blanco potencial para la intervención farmacéutica (Figura 7) (Gloster et al., 2011).



**Figura 7. O-GlcNAc y los sellos distintivos del cáncer.** Se muestran algunos vínculos entre la O-GlcNAcilación y los sellos distintivos del cáncer. Las proteínas resaltadas en rojo están directamente modificadas por O-GlcNAc. Basado en Ma and Vosseller, 2014.

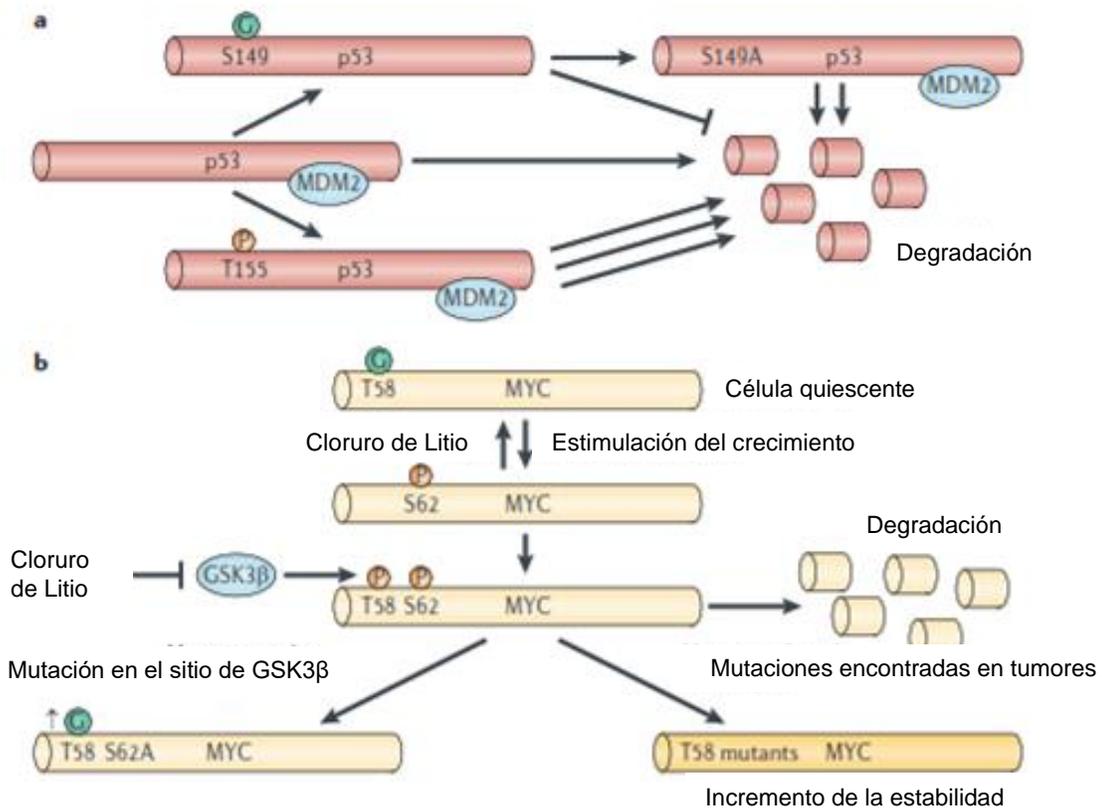
Evidencia creciente sugiere que la O-GlcNAcilación podría impactar a los procesos de reparación del DNA; esta modificación se relacionó con la actividad de la enzima Topo I, y se reportó que los niveles incrementados de O-GlcNAc aumentan su actividad (Noach et al., 2007). Recientemente, se reportó la O-GlcNAcilación de la histona H2AX y de MDC1: OGT se relocaliza en sitios de daño en el DNA y regula de forma negativa la fosforilación inducida por el rompimiento de la doble cadena de la histona H2AX y MDC1, limitando la expansión de los eventos de fosforilación desde el sitio inicial del daño (Chen and Yu, 2016). Esta función fisiológica normal de OGT, si es desregulada, podría ser la responsable de la capacidad de reparación alterada del DNA en cáncer. Por lo que se ha sugerido que la O-GlcNAcilación tiene un papel central en la reprogramación metabólica de las células cancerosas contribuyendo a los cambios en la reparación del DNA.

La alteración en la actividad de los factores de transcripción ya sea por mutaciones o por expresión génica es un mecanismo bien descrito en la progresión celular, de un estado normal a uno canceroso. Los cambios en la actividad de los factores de transcripción pueden provocar alteraciones mayores en la expresión génica, resultando en un incremento en la proliferación, la estimulación de la angiogénesis, crecimiento invasivo y metástasis. Más del 50% de los tipos de cánceres descritos contiene mutaciones en el gen de p53, por lo que se le considera como el mayor guardián de la estabilidad genética. Bajo condiciones de estrés celular, daño ambiental o daño en el genoma, la expresión y estabilidad de p53 aumenta, seguido de la inducción de genes que promueven el arresto del ciclo celular, la apoptosis y la autofagia debido a su papel esencial en el mantenimiento de la integridad

genómica. p53 está regulando por degradación proteolítica; la ligasa de ubiquitina MDM2 se une a p53 regulando de forma negativa su expresión y promoviendo su degradación (Brady and Attardi, 2010). La estabilidad de p53 también es afectada por la fosforilación, el dominio amino-terminal del supresor tumoral contiene el dominio de transactivación y diversos sitios conocidos de fosforilación. La fosforilación de Ser18 y Ser23 promueve la estabilidad de p53, mientras que la fosforilación en la Thr155 (el cual reside en el dominio de unión de DNA) promueve su degradación. Se ha descrito que la O-GlcNAcilación de p53 en la Ser149 es antagonista a la fosforilación de Thr155, por lo que la O-GlcNAcilación de la Ser149 incrementa la actividad y estabilidad de p53 (Dai and Gu, 2010).

Por otro lado, c-MYC se expresa en más del 50% de los cánceres humano y se estima que se une a más del 15% de todos los promotores génicos en el genoma, muchos de sus blancos están asociados a la regulación del ciclo celular y la replicación, también se han identificado enzimas glicolíticas y transportadores de glucosa. En el caso de esta oncoproteína, la fosforilación y la O-GlcNAcilación de la Thr58 tienen una relación claramente recíproca. En células quiescentes, Thr58 esta O-GlcNacilada pero se fosforila por GSK3 $\beta$  después de algunos estímulos. Thr58 se encuentra en el dominio de transactivación de la proteína, su fosforilación conlleva a su rápida degradación resultando en la pérdida de la expresión de MYC (Gregory et al., 2003). Sin embargo, antes de que GSK3 $\beta$  pueda fosforilar Thr58, es necesaria la fosforilación de la Ser62. Esta fosforilación puede llevarse a cabo por una gran variedad de cinasas y promueve la estabilidad de MYC. La mutación de Ser62 a Ala causa un incremento en la O-GlcNAcilación de Thr58; asimismo, la

inhibición de GSK3 $\beta$  también incrementa la O-GlcNAcilación de Thr58. La fosforilación jerárquica de Thr58 y Ser62 es importante en la regulación de la función de MYC: Thr58 está mutada en una variedad de linfomas, lo que lleva a que MYC sea más estable (Slawson and Hart, 2011). La O-GlcNAcilación de c-MYC promueve su estabilidad, resultando en un mal pronóstico y recurrencia en muestras clínicas de pacientes con cáncer de próstata (Itkonen et al., 2013). Más aun, la O-GlcNAcilación de c-MYC se ha implicado en varios tipos de cáncer incluyendo próstata, mama, hígado, y leucemia (Chou et al. 1995; Chou and Hart 2001) (Figura 8).



**Figura 8. Regulación de factores de transcripción por O-GlcNAc.** a) El supresor tumoral p53 se asocia con la proteína MDM2, la cual mantiene a p53 en niveles bajos en las células al promover su degradación. La fosforilación (P) en Thr155 estimula la degradación rápida de p53 mientras que la O-GlcNAcilación (G) en la Ser149 impide la unión de MDM2 y promueve la estabilidad de p53. Las mutaciones que anulan a la O-GlcNAcilación en p53 promueven la degradación. b) En las células quiescentes, la oncoproteína MYC es O-GlcNAcilada en Thr58. A través de diversas señales de crecimiento, O-GlcNAc es removida rápidamente y Myc es fosforilada en la Ser62. Este sitio es un cebador para GSK3 $\beta$ , la cual puede posteriormente fosforilar a Thr58, promoviendo a la degradación rápida de MYC. Diversos tumores sólidos tienen mutaciones en Thr58, lo que promueve el incremento de la estabilidad de MYC y la transcripción génica alterada. La inhibición de GSK3 $\beta$  por cloruro de litio o por mutaciones en la Ser62 incrementa la O-GlcNAcilación de Thr58. Tomado de Slawson and Hart, 2011

Por otro lado, NF $\kappa$ B es O-GlcNAcilado en Thr322 y Thr353, y la O-GlcNAcilación en Thr322 es crítica para la liberación de NF- $\kappa$ B de la inhibición de I $\kappa$ B permitiendo su translocación nuclear en células pancreáticas cancerosas. La hiper-O-GlcNAcilación de NF $\kappa$ B promueve la activación de la fosforilación de la Ser536, su translocación nuclear y su actividad transcripcional (Ma et al., 2013). También, en células MCF7 de cáncer de mama, la entrada al ciclo celular debido a la estimulación por suero se asocia a la unión progresiva de OGT y la O-GlcNAcilación de  $\beta$ -catenina. Por otro lado, la expresión de  $\beta$ -catenina en células de CRC correlaciona con el flujo de la vía HBP y con la consecuente O-GlcNAcilación (Olivier-Van Stichelen et al., 2012). Debido a lo anterior, la O-GlcNAcilación de los factores de transcripción es importante en la regulación del crecimiento, proliferación y metabolismo de las células cancerosas.

En la vía glucolítica, se ha mostrado la O-GlcNAcilación en PKM2, las piruvatoquinasas catalizan el último paso de la glucólisis, el cual involucra la desfosforilación del fosfoenolpiruvato a piruvato, causando una red de producción de ATP. La isoforma PKM2 es parte del complejo glucolítico; tiene una señal de localización nuclear inducible y puede desempeñar funciones nucleares además de su rol en la

producción de piruvato y ATP (Yu and Li, 2017). Se ha sugerido que la O-GlcNAcilación de PKM2 en células cancerosas colorrectales incrementa su expresión, aunque disminuye su actividad enzimática; por lo que se postuló que la O-GlcNAcilación puede tener múltiples funciones dependiendo de la localización de la enzima. La reacción catalizada por las piruvato-cinasa es crítica para el fenotipo canceroso ya que se ha observado que la expresión elevada de PKM2 en las células cancerosas colorrectales es consistente con los niveles incrementados de la producción de piruvato y la producción incrementada de ATP a través de la vía típica de la glucólisis (Chaiyawat et al., 2015).

Por otro lado, también se ha descrito que la vía de señalización PI3K-AKT es crucial para el desarrollo del fenotipo canceroso; PI3K es uno de los genes más mutados en diversos tipos de cáncer y su rol central en la activación lo convierte en un blanco putativo para los fármacos anticancerosos. La cinasa AKT interactúa con los PIP<sub>3</sub> producidos por PI3K en la cara interna de la membrana plasmática desencadenando una cascada de cinasas esencial para la regulación del crecimiento. De forma similar a AKT, se ha mostrado que OGT también puede ser traslocado en la membrana celular en respuesta a la activación de PI3K (Yang et al., 2008). Más aún, se ha mostrado que AKT puede ser O-GlcNAcilado directamente (Kang et al. 2008; Krześlak et al. 2011). Los hallazgos anteriores sugieren que OGT participa activamente en la cascada de señalización que es alterada por PI3K-AKT.

El carcinoma hepatocelular está caracterizado por los cambios en la vía YAP-Hippo (Valero et al., 2015). Esta vía es desregulada en la tumorigénesis del hígado en un proceso estimulado por una alta concentración de glucosa (Zhang et al., 2017).

Previamente fue demostrado que el protooncogén Yes, un miembro de la familia de cinasas SRC, es O-GlcNAcificado; esta cinasa es un componente clave en la cascada de señalización de Hippo e interactúa con YAP, la cual actúa como coactivador transcripcional (Lazarus et al., 2006). Recientemente se identificó a la Thr241 de YAP como un sitio de O-GlcNAcificación, al mutar este sitio, disminuyó la O-GlcNAcificación, la estabilidad y las capacidades pro-tumorigénicas de la proteína (Zhang et al., 2017). Por lo anterior, se ha sugerido que muchos de los genes altamente mutados o sobreexpresados en cáncer son dependientes de la O-GlcNAcificación para su funcionamiento apropiado (Hanover et al., 2018).

La transformación oncológica frecuentemente involucra una hipometilación global del DNA, la hipermetilación de promotores génicos y las modificaciones aberrantes postraduccionales de las histonas. Existe evidencia que indica que OGT afecta los estados de la cromatina tanto locales como globales al interactuar con diversas enzimas responsables de la metilación del DNA y de las modificaciones de las histonas (Zhang and Reinberg, 2001). En células cancerosas, muchos reguladores epigenéticos son modificados por O-GlcNAc cambiando sus actividades; entre ellos se incluyen Sin3, HCF-1, TET, LSD2, una dimetilasa de la histona H3K4me1/me2, directamente ubiquitina y promueve la degradación dependiente de proteasoma de OGT, inhibiendo el crecimiento de las células de cáncer de pulmón de forma dependiente de la actividad ligasa E3 (Yang et al., 2015). La enzima HDAC1 también es modificada por O-GlcNAc, la modificación ocurre en al menos 2 sitios y altera su fosforilación afectando la progresión del cáncer hepatocelular si sus sitios modificados son mutados (Zhu et al., 2016). Asimismo, la deacetilasa dependiente

de NAD<sup>+</sup>, SIRT1 también es regulada por O-GlcNAc, al reducir los niveles de esta modificación se eleva la expresión de SIRT1 y su actividad de forma dependiente a AMPK (Ferrer et al., 2017). OGA es una enzima bifuncional que tiene una actividad de hidrolasa de O-GlcNAc así como actividad de HAT, implicando una relación intrínseca entre la O-GlcNAcilación y la acetilación de las histonas. La asociación con la metilación del DNA y la modificación de histonas sugiere que OGT desempeña un fundamental en la integración transcripcional y la regulación epigenética. Ya que se ha reportado previamente que el epigenoma es susceptible a los cambios metabólicos como la dieta, O-GlcNAc tiene un rol central en integrar la reprogramación metabólica y epigenética en cáncer (Singh et al., 2015).

El metabolismo de O-GlcNAc está fuertemente integrado a la respuesta celular al estrés y recientemente se ha asociado a la detección de hipoxia y estrés oxidativo. Una de las principales repuestas a hipoxia es mediada por la activación transcripcional de HIF-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  es uno de los reguladores clave de la glucólisis en células cancerosas al alterar la expresión de su blanco transcripcional GLUT1. Se demostró que la reducción de la O-GlcNAcilación elevó los niveles de  $\alpha$ -cetoglutarato, la hidroxilación de HIF-1 y la interacción con la proteína pVHL, finalmente conllevando a un incremento de la degradación de HIF-1 $\alpha$ . Además, se encontraron que las células cancerosas de mama con niveles altos de HIF-1 $\alpha$  también tiene niveles incrementado de OGT y niveles reducidos de OGA. A partir de los hallazgos anteriores, se postuló que la O-GlcNAcilación puede regular el metabolismo canceroso y la señalización en respuesta de estrés a través de la regulación indirecta de HIF-1 $\alpha$  (Ferrer et al., 2014). Por lo anterior, la O-

GlcNAcilación ha sido implicada con la reprogramación metabólica en el microambiente tumoral donde puede ocurrir en condiciones de normoxia e hipoxia.

Se ha descrito ampliamente que la O-GlcNAcilación tiene un papel importante en el desarrollo de la metástasis tumoral: la reducción de la hiper-O-GlcNAcilación en la línea celular PC-3ML y en las células cancerosas HEPG2, suprime la expresión de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 (Zhu et al., 2012; Lynch et al., 2012). Por otro lado, se ha demostrado que al incrementar los niveles de O-GlcNAc se promueve la migración/invasión de células cancerosas de mama y próstata mientras que la disminución de los niveles por knock-down de OGT, inhibe la invasión tumoral y metástasis.

La O-GlcNAcilación ha sido considerada como uno de los vínculos entre el metabolismo de glucosa y la adquisición de características relacionadas a EMT, ya que influencia la plasticidad celular al modificar proteínas claves (Alisson-Silva et al., 2013; Taparra et al., 2016). Una de las moléculas más estudiadas es la proteína de adhesión intracelular E-cadherina, la cual ha sido postulada como supresor de la invasión tumoral. Durante la desestabilización de las uniones adherentes, E-cadherina se corta en la membrana plasmática y es degradada (Yilmaz and Christofori, 2009). La O-GlcNAcilación de E-cadherina en su dominio citoplásmico inhibe su tráfico hacia la membrana plasmática lo cual promueve una reducción de la adhesión intercelular mediada por E-cadherina (Zhu et al., 2001). También, se ha demostrado que Snail1 está O-GlcNAcilada en la Ser112 lo que suprime la degradación mediada por fosforilación; se sugirió que durante condiciones hiperglicémicas, existe un incremento en la O-GlcNAcilación de Snail1, lo que

estimula el desarrollo de EMT a través de la supresión transcripcional de E-cadherina (Park et al., 2010). Asimismo, también se describió el impacto de la O-GlcNAcilación en la estabilidad de vimentina, estimulando la migración celular (Phoomak et al., 2017). En concordancia con lo anterior, se ha reportado que la reducción de los niveles de hiper-O-GlcNAcilación en cáncer incrementa la expresión de E-cadherina y disminuye la expresión de vimentina, mientras que elevarlos disminuye la expresión de E-cadherina en células de cáncer de mama (Gu et al., 2010; Ma et al., 2013; Park et al., 2010).

Por otro lado, el incremento de la O-GlcNAcilación puede aumentar la expresión de  $\beta$ -catenina en el colon de ratones alimentados con glucosa, así como en las líneas celulares MCF7 y HT29 previamente tratadas con concentraciones altas de glucosa (Olivier-Van Stichelen et al., 2012). La O-GlcNAcilación de  $\beta$ -catenina en células de colon puede afectar su estabilidad y localización en la membrana plasmática (Olivier-Van Stichelen et al., 2014). La modulación de los niveles de O-GlcNAc impacta en la expresión y distribución de los niveles de los complejos E-cadherina/catenina en los cuales el incremento de la O-GlcNAcilación conllevan a una disminución de E-cadherina en la superficie celular y, por lo tanto, una reducción de la adhesión intercelular (Gu et al., 2010).

También se reportó un incremento en los niveles de O-GlcNAcilación y en la expresión de OGT en células A549 durante el progreso de EMT inducido por TGF- $\beta$ . La modulación de los niveles de O-GlcNAc indujo cambios en la morfología y la movilidad celular, además regulación negativa de OGA desencadenó diferenciación celular a un perfil mesenquimal. Mas aún, las células que expresan niveles bajos de

OGA presentaron una capacidad migratoria incrementada, reducción de la expresión de E-cadherina y, un incremento en la expresión de N-cadherina, indicando que al incrementar los niveles de O-GlcNac pueden desencadenar el desarrollo de EMT (Lucena et al., 2016). Por otro lado, se reportaron niveles incrementados de O-GlcNAcilación y de OGT en CRC primario en comparación con tejido no neoplásico, mientras que las lesiones de nódulos metastásicos mostraron niveles marcadamente reducidos en comparación con CRC primario (Jang, 2016). Adicionalmente, se observó un incremento de la O-GlcNAcilación y de los niveles de GFAT en líneas celulares de cáncer de colon HT29 y HCT116 en comparación con la línea celular fetal CCD841CoN. Más aún, el silenciamiento de OGT desorganiza los microfilamentos, microtúbulos y las redes de vinculina en las células CCD841CoN modificando la forma celular (Steenackers et al., 2016). En resumen, existe una gran cantidad de evidencia que sugiere el papel importante de la O-GlcNAcilación en el desarrollo del fenotipo canceroso y en la modulación de la plasticidad celular durante el desarrollo de EMT.

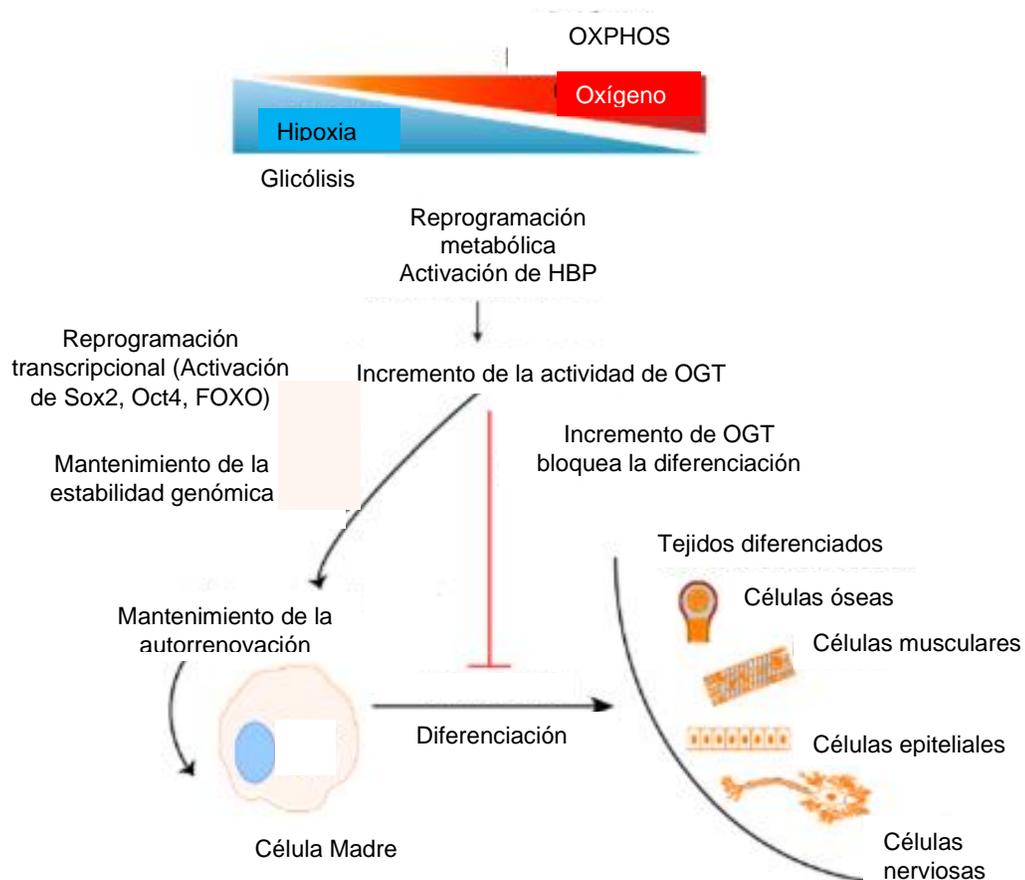
### **1.2.3 O-GlcNAc y su papel en la troncalidad**

La habilidad de proliferar sin linaje específico (autorrenovación) y la capacidad de diferenciación en uno o más tipos celulares especializados (o pluripotencia) son 2 características principales de las células troncales. Las necesidades nutricionales, las vías metabólicas y una elaborada red transcripcional, son esenciales para mantener la troncalidad en las células madre. Recientemente, se ha resaltado que los nutrientes en el ambiente celular y los transportadores requeridos para su

asimilación, pueden desempeñar un papel importante en el mantenimiento y la regulación de la supervivencia de las células troncales (Sharma et al., 2018).

Se ha observado que las ESC (Folmes et al., 2012), HSC (Zhang et al., 2016), MSC (Chen et al., 2008) y las células troncales hepáticas (Turner et al., 2008) basan su metabolismo en la glucólisis como su principal fuente de energía. Además, está bien establecido que las células troncales que se originan en nichos hipóxicos tienden a tener una actividad glucolítica incrementada como resultado de una ingesta incrementada de glucosa en condiciones anaerobias (Simsek et al., 2010). Más aún, se ha demostrado que la estimulación de la glucólisis a través de la hipoxia en células troncales pluripotentes (Mohyeldin et al., 2010), la inhibición de la respiración mitocondrial (Varum et al., 2009) o la suplementación con insulina (Chen et al., 2011) promueven la troncalidad mientras que la inhibición de la glucólisis impide la proliferación y promueve la muerte celular (Kondoh et al., 2007). Además de la glucosa, la glutamina también es ingerida activamente por las células troncales embrionarias (Marsboom et al., 2016). El metabolismo de glutamina se regula negativamente a través de la diferenciación, también, se requiere para mantener los niveles elevados de GSH y la disminución de glutamina conlleva al incremento de los niveles de ROS (Yanes et al., 2010). Como ya se mencionó anteriormente, esto promueve un aumento en el flujo a la vía HBP, un aumento en la concentración de UDP-GlcNAc y el subsecuente incremento de los niveles de O-GlcNAc. Ya que la actividad de OGT es dependiente del flujo de nutrientes y que a su vez el metabolismo influye en la capacidad de autorrenovación característica de las células troncales, se ha hipotetizado que OGT es un determinante clave entre los

genes de autorrenovación y su interconexión con el estatus metabólico de la célula (Figura 9) (Sharma et al., 2018).



**Figura 9. Modelo en el que se muestra el papel de O-GlcNAc en el mantenimiento de la troncalidad.** En el nicho de las células troncales o dentro del tumor, la concentración baja de oxígeno produce un incremento en la hipoxia y en la señalización mediada por hipoxia, lo que lleva a un incremento en la ingesta de glucosa y de glicólisis. Una parte de la glucosa llega a la vía HBP promoviendo la producción de UDP-GlcNAc, el sustrato de OGT. La actividad incrementada de OGT afecta la actividad transcripcional de las proteínas Sox2, Oct4 y FoxO para mantener la estabilidad genómica como también el mantenimiento de la autorrenovación. El incremento de la actividad de OGT también previene la diferenciación hacia tejidos específicos, contribuyendo al mantenimiento de la troncalidad. Tomado de Sharma et al., 2008.

Por otro lado, los factores de transcripción conocidos como “factores de Yamanaka” son considerados como las proteínas críticas que regulan la troncalidad y la capacidad de autorrenovación (Takahashi and Yamanaka, 2006). En respuesta a

los estímulos nutricionales y microambientales, estas proteínas actúan en conjunto para promover la diferenciación o la autorrenovación. De forma interesante, estos factores están modificados por la adición de O-GlcNAc, lo cual determina su actividad. El hecho de que sean dependientes del flujo de glucosa a través de HBP y la actividad de OGT, indica que tanto el metabolismo celular y nutricional regulan la actividad transcripcional de SOX2, OCT4, MYC y KLF4. Durante la reprogramación celular, como evento inicial, estos factores promueven el cambio metabólico, lo que conlleva a la activación de la maquinaria transcripcional adicional dirigiendo la reprogramación de las células cancerosas. Favorecer la glucólisis sobre OXPHOS promueve una mínima producción de ROS, estos niveles disminuidos de ROS protegen a las CSCs contra los daños en el DNA y la apoptosis, ayudando al mantenimiento de la función celular troncal (Kobayashi and Suda, 2012). Como ya se mencionó anteriormente, MYC es modificado por OGT en la Thr58 que se encuentra en el dominio de transactivación de la proteína. En cáncer, la O-GlcNAcilación de MYC promueve un aumento en la transformación celular y la tumorigenicidad (Chou et al., 1995). También se ha mostrado que la modificación de c-MYC por OGT en muestras clínicas de cáncer de próstata promueve su estabilización resultando en un mal pronóstico y recurrencia (Itkonen et al., 2013). Además, se reportó que la O-GlcNAcilación de SOX2 en la Ser 248 es regulada de forma dinámica en mESCs (Myers et al., 2016). La O-GlcNAcilación inhibe directamente a la interacción de SOX2 y PARP1, lo que tiene un papel regulatorio en la pluripotencia de las mESC (Gao et al., 2012; Lai et al., 2012).

Por otro lado, la familia de factores de transcripción FOXO también es dependiente al flujo a través de HBP ya que es modificada por la adición de O-GlcNAc (Kuo et al. 2008; Housley et al. 2008). Las proteínas FOXOs ayudan a prevenir la acumulación de ROS en las células troncales, manteniendo la integridad celular (Ito et al., 2004). En ESCs humanas, FOXO1 regula la expresión de los factores de transcripción cruciales para la troncalidad, OCT4 y SOX2 (Zhang et al., 2011). También, en células troncales de origen neural, FOXO3 regula la expresión de genes involucrados en la señalización por hipoxia (Renault et al., 2009). Debido a lo anterior, esta familia de proteínas es un nodo mayor que integra la transcripción y el metabolismo de las células troncales. En cáncer de mama, la expresión de FOXM1 es dependiente de la modificación por O-GlcNAc, la disminución de O-GlcNAc se asoció con el decremento en la progresión del ciclo celular y el incremento en la expresión de p27 (Caldwell et al., 2010). Adicionalmente, la vía de señalización de Notch es esencial en un diverso número de vías asociadas con el desarrollo; se mostró que la modificación por O-GlcNAc de Notch1 promueve la traslocación dependiente de JNK de Notch1 escindida al núcleo, lo que resulta en un incremento en la producción de glucosa y en el mantenimiento de la autorrenovación de mESC (Jeon et al., 2014).

Además de regular transcripcionalmente la capacidad de autorrenovación y diferenciación de las células troncales, O-GlcNAc también regula la troncalidad a un nivel epigenético. El aumento en la O-GlcNAcilación promueve la regulación positiva de genes que normalmente están silenciados en ESC, apoyando el rol emergente de esta modificación en la regulación de las modificaciones de las histonas y la

metilación del DNA (Speakman et al., 2014). Las proteínas TET son las responsables de controlar la metilación del DNA genómico y la diferenciación. Se ha especulado que la regulación de las proteínas TET es dependiente de la modificación de histonas. Chen et al., en 2013 confirmó esta hipótesis al mostrar que la O-GlcNAcilación de H2B112 es regulada por TET2 en ESC (Chen et al., 2013).

Además, aumentar los niveles de O-GlcNAc promueve la supervivencia de las células troncales cardíacas, mientras que una reducción de los niveles a través de la inhibición farmacológica o una delección genética las sensibiliza al daño causado por hipoxia (Zafir et al., 2013). La modulación de la O-GlcNAcilación intracelular puede también influenciar la diferenciación de las ESCs. Al reducir los niveles de O-GlcNAc de OCT4 y SOX2 a través de la inhibición de OGT o reduciendo la concentración de glucosa, se altera la capacidad de renovación de ESC y la reprogramación nuclear (Jang et al., 2012). También, algunos estudios han reportado que la pérdida de OGT promueve la mortalidad en ESCs (Shafi et al., 2000). Por lo anterior, la función de O-GlcNAc es crítica para la autorrenovación y el mantenimiento de las células troncales, mientras que una disminución conlleva a la diferenciación.

La autorrenovación en las células cancerosas es atribuida a las células iniciadoras de tumor o CSCs. Como ya se mencionó anteriormente, pueden originarse debido a la acumulación de mutaciones en las células troncales embrionarias o células progenitoras o surgen como consecuencia de la interacción con el microambiente. En el cáncer pancreático, el microambiente hipóxico, los fármacos

quimioterapéuticos, y el estrés nutricional causan un incremento en la población de células con una expresión elevada de diversos genes asociados a la autorrenovación; además, esta población presenta propiedades incrementadas de quimioresistencia (McGinn et al., 2017). De forma similar, la tumorigénesis del cáncer de mama es regulada por la modificación de O-GlcNAc de FOXM1 (Caldwell et al., 2010). También, en CRC, O-GlcNAc media la regulación epigenética de MYBL1 para promover tumorigénesis (Guo et al., 2017). Mas aún, el represor transcripcional BMI-1 frecuentemente se sobreexpresa y participa en la renovación de las CSCs y promueve la tumorigénesis del cáncer de próstata; recientemente, se mostró que la O-GlcNAcilación promueve la estabilidad de BMI-1 y a su actividad oncogénica (Li et al., 2017).

Sin embargo, aunque existen muchos estudios que resaltan el papel de O-GlcNAc en la progresión tumoral, aún no es claro si tiene un papel activo en la autorrenovación y la recurrencia tumoral al regular los factores de Yamanaka. Por lo que son necesarios estudios que profundicen para revelar que rol desempeña la O-GlcNAcilación en la generación y mantenimiento de CSCs.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se ha resaltado el papel de la O-GlcNAcilación como regulador en diversos procesos celulares y se ha reportado que niveles elevados de O-GlcNAc se asocian al establecimiento del fenotipo maligno en distintos tipos de cáncer, incluyendo CRC. Asimismo, existen reportes que involucran a la O-GlcNAcilación en mecanismos de pluripotencia y autorrenovación. No obstante, la función que tiene esta modificación en el establecimiento de las CSCs no ha sido completamente dilucidado. Debido a lo anterior, el objetivo del trabajo es determinar si los niveles alterados de O-GlcNAc descritos en cáncer de colon están relacionados con el establecimiento de las CSC.

## **3. HIPOTESIS**

Los niveles alterados de O-GlcNAc descritos previamente en CRC están asociados con el establecimiento de las CSCs.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar sí la alteración de los niveles de O-GlcNAc están asociados con el establecimiento de las CSCs usando como modelo el CRC.

#### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Identificar el perfil de expresión de los marcadores de CSC en las células de CRC.
- Verificar la alteración de los niveles de O-GlcNAc, y los niveles de expresión de OGT y OGA en las líneas cancerosas de colon y compararlos con los niveles de células de colon normal.
- Investigar el efecto de la inhibición farmacológica de las enzimas OGT y OGA en la expresión de marcadores de CSC.
- Dilucidar sí la inhibición de OGT afecta el fenotipo maligno de las células cancerosas de CRC.
- Analizar sí el estrés nutricional mimetiza el efecto de la inhibición de OGT en la expresión de los marcadores de CSCs.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Reactivos y anticuerpos**

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados para citometría de flujo: anticuerpo primario monoclonal producido en ratón contra CD44 conjugado a APC de BD Biosciences; anticuerpo primario monoclonal producido en ratón contra CD133 conjugado a PE de Miltenyi Biotec. Para la técnica de WB: anticuerpos primarios monoclonales producidos en conejo contra CD44 y contra CD133; anticuerpo primario monoclonal producido en ratón contra OGT de Abcam; anticuerpo primario monoclonal producido en conejo contra  $\beta$ -tubulina de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); anticuerpo primario producido en ratón contra-GAPDH de Santa Cruz Biotechnology Inc (Sta. Cruz, CA, USA). Para microscopía confocal: anticuerpo secundario policlonal producido en conejo acoplado a Alexa 647 de Invitrogen; anticuerpo secundario policlonal producido en conejo acoplado a Alexa 488 de Molecular Probes, Inc., (Eugene, OR, USA). Para la detección de los niveles de O-GlcNAc en todas las técnicas, se utilizó el anticuerpo primario monoclonal producido en ratón RL2 de Thermo Fisher Scientific.

### **6.2 Líneas celulares**

Se utilizó la línea primaria celular de origen colorrectal SW480 y su derivado metastásico SW620, ambas expresan una versión trunca de APC, tiene la vía de señalización Wnt activa constitutivamente y son células cancerosas prototipo dirigidas por KRAS (Mutaciones en KRAS G12V, APC A1457T/K1462R, FGFR3 S400R, TP53 R273H y STK11 G58S) (Itkonen et al., 2016). Las líneas mencionadas

anteriormente y la línea celular de colon no maligna 112CoN usadas en el presente trabajo se adquirieron de la ATCC (Manassas, VA, USA) y fueron autenticadas en junio de 2017 mediante el perfil de repeticiones en tándem de DNA llevado a cabo por el Instituto Nacional de Medicina Genómica en la Ciudad de México.

### **6.3 Cultivos celulares**

Las células 112CoN fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS, antibióticos (120 mg/ml penicilina and 200 mg/ml estreptomicina) y 2 mM de L-glutamina. Las células SW480 and SW620 fueron mantenidas en DMEM-F12 suplementado con 5% de FBS, antibióticos y 2 mM de glutamina. Todos los cultivos celulares fueron cultivados en un incubador humidificado al 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para el ensayo de ayuno, las células fueron lavadas 2 veces con PBS (GIBCO/Invitrogen) y colocadas en buffer HBSS (GIBCO/Invitrogen).

### **6.4 Western Blot**

Primero, se realizó la lisis de los cultivos celulares, brevemente, las cajas de cultivo se lavaron 2 veces con PBS y se agregó buffer de lisis. La muestra se recuperó y fue centrifugada a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C y el sobrenadante fue almacenado a 4°C hasta su uso. Las muestras proteicas (30µg) se separaron por SDS-PAGE al 10% seguido de la transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas al 5% con leche libre de grasa incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario monoclonal correspondiente. La detección se llevó a cabo usando el kit Super Signal (Pierce) con un anticuerpo secundario policlonal

conjugado a peroxidasa de rábano. Como control se usaron los anticuerpos contra actina, GAPDH o  $\beta$ -tubulina.

## **6.5 Microscopía confocal e inmunofluorescencia**

Las células se sembraron en portaobjetos de cultivo con 8 cámaras individuales (LabTek®) a una confluencia de  $5 \times 10^4$  células/ml durante toda la noche. Posteriormente, las muestras se fijaron con 1% (v/v) de paraformaldehído en PBS por 10 minutos a RT. Las células fijadas se lavaron con PBS y fueron permeabilizadas con 1% (v/v) de tritón X-100 en PBS por 5 minutos. Los sitios inespecíficos de interacción fueron bloqueados con 3% (w/v) de BSA/PBS. Después de los lavados, los portaobjetos fueron incubados con anticuerpos monoclonales primarios contra O-GlcNAc, CD133 o CD44 (Abcam) diluidos en 1% (m/v) de BSA/PBS toda la noche a 4°C protegidos de la luz. Las células se lavaron con PBS y fueron incubadas con anticuerpos secundarios policlonales acoplados a Alexa Fluor 647 o Alexa 488 (Invitrogen) durante 2 horas a RT. El portaobjetos fue incubado con DAPI (SIGMA Aldrich) en PBS por 5 minutos RT. Después se lavaron 3 veces con PBS; finalmente se agregó medio de montaje Vectorshield (Vector Labs, CA) y los portaobjetos fueron sellados. Las muestras se examinaron con el microscopio confocal Nikon A1R+ STORM en la unidad de microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImageJ.

## 6.6 Citometría de flujo

Para la tinción membranal de CD133 y CD44:  $1 \times 10^4$  células fueron desprendidas con solución PBS/EDTA 10mM, raspadas de la caja de cultivo ligeramente y colectadas por centrifugación a 1200 RPM. El botón celular se lavó 2 veces con PBS y las células fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-CD44 acoplado a APC (BD Bioscience), anti CD133 acoplado a PE (Myltenyi) o un mix de anticuerpos CD44/CD133 durante 20 minutos a 4°C protegido de la luz. Después, a las células se agregó PBS y fueron centrifugadas nuevamente. Finalmente, las muestras fueron analizadas con el citómetro de flujo Attune®.

Para la tinción intracelular de OGT y O-GlcNAc: las células fueron desprendidas de la misma forma mencionada anteriormente pero inmediatamente fueron fijadas con 1% (v/v) de paraformaldehído en PBS por 10 minutos a 4°C. Una vez permeabilizadas, fueron fijadas con metanol absoluto por 20 minutos en hielo y los sitios inespecíficos de interacción fueron bloqueados con 3% (w/v) de PBS/BSA. Los anticuerpos primarios monoclonales anti O-GlcNAc o anti-OGT fueron incubados durante 30 minutos a 4°C protegidos de la luz. Las células fueron lavadas una vez e incubadas con anticuerpos secundarios anti-ratón acoplado FITC o anti-conejo acoplado a FITC. Se lavaron nuevamente y finalmente fueron analizadas con el citómetro FACScalibur. Todos los datos adquiridos por citometría de flujo fueron analizados con el programa FlowJo X.

## **6.7 Aislamiento celular por FACS**

De la misma forma que en la citometría de flujo, las células fueron desprendidas y las muestras resultantes fueron incubadas con anticuerpos primarios monoclonales anti-CD44 acoplado a APC, anti-CD133 acoplado a PE o un mix de ambos durante 20 minutos a 4°C protegidos de la luz. Las células se lavaron, se filtraron y fueron colectadas en tubos estériles especiales para citometría de flujo. El aislamiento celular para separar las subpoblaciones CD44+, CD133+ o CD44/CD133 (dobles positivas), se llevó a cabo en un citómetro MoFlow Sorter. Al concluir el aislamiento, las células se sembraron en medios de cultivo distintos con base en el ensayo que se llevaría a cabo: DMEM F-12 con 5% (v/v) FBS, medio de formación de colonias con ITS o medio para cultivo 3D.

## **6.8 Inhibidores farmacológicos**

$8 \times 10^5$  células fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pozos y se incubaron durante toda la noche. Posteriormente, para la inhibición de OGT, las células se incubaron durante 24h en ausencia (usando como control la adición de DMSO como vehículo) o en presencia de Ac5SGlcNAc (en una dilución final de 50  $\mu$ M). Para la inhibición de OGA, las células fueron incubadas durante 24 h en ausencia o presencia de Thiamet-G (en una dilución final de 1  $\mu$ M). Las células fueron incubadas a 37°C, se capturaron imágenes de los cultivos celulares para cada tratamiento al final de los periodos de incubación. Las células finalmente fueron colectadas para llevar a cabo los ensayos de citometría de flujo o hacer lisados celulares para WB.

## **6.9 Apoptosis**

La apoptosis se midió usando el kit de tinción Annexin-V-FLUOS (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. De forma resumida, después de 24 h de incubación con los inhibidores Ac5sGlcNAc o Thiamet G, las células fueron raspadas de la caja de cultivo ligeramente (no se usó tripsina para desprender las células con el fin de evitar la exposición inespecífica de Anexina V), se centrifugaron y lavaron 2 veces con PBS. Se añadió Anexina-FITC y yoduro de propidio en el buffer de tinción a la suspensión celular y fueron incubadas por 10 minutos a RT. Las células fueron analizadas con el citómetro de flujo Attune®.

## **6.10 Ensayo de proliferación**

La proliferación fue medida al teñir a las células con el kit de proliferación celular CellTrace (Invitrogen) el cual utiliza el colorante fluorescente CFSE para monitorear las generaciones celulares, ya que la señal disminuye a la mitad con cada ciclo de división celular.  $5 \times 10^4$  células se incubaron con CFSE (en una dilución final de 1  $\mu$ M) en PBS durante 20 minutos a 37°C. Después, las células se centrifugaron y fueron sembradas en placas de cultivo de 12 pozos. Las células se incubaron en ausencia o presencia de los inhibidores Ac5sGlcNAc o Thiamet-G durante 24h. Finalmente, las células se colectaron, centrifugaron y analizaron mediante citometría de flujo en el citómetro FACScalibur.

### **6.11 Ensayo de formación de colonias**

Después del aislamiento celular, 500 células fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pozos con medio DMEM-F12 suplementado con ITS 1X. Después de 2 semanas, se adquirieron imágenes para cada condición experimental y las colonias en la caja de cultivo fueron contabilizadas.

### **6.12 Cultivo 3D**

Después del aislamiento celular, 500 células fueron sembradas en cajas de cultivo de adherencia baja de 6 pozos con medio DMEM F-12 suplementado con B27 (2% v/v) y EGF (20ng/ml) por duplicado. Después de 3 semanas, se adquirieron imágenes para cada condición experimental y los esferoides se colectaron para ser lisados y analizados por WB.

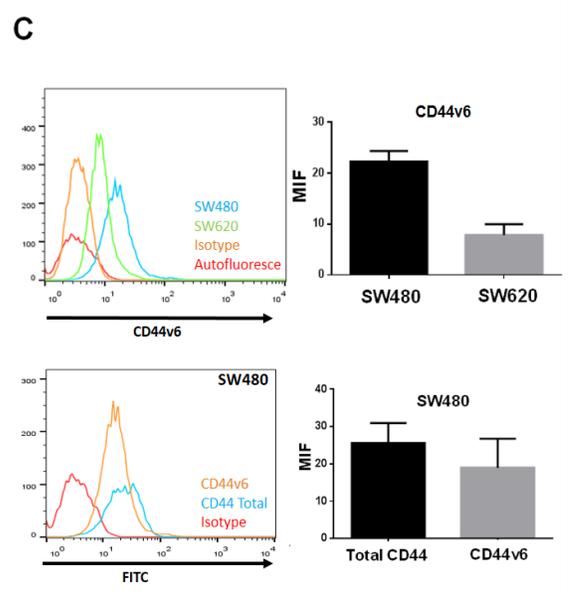
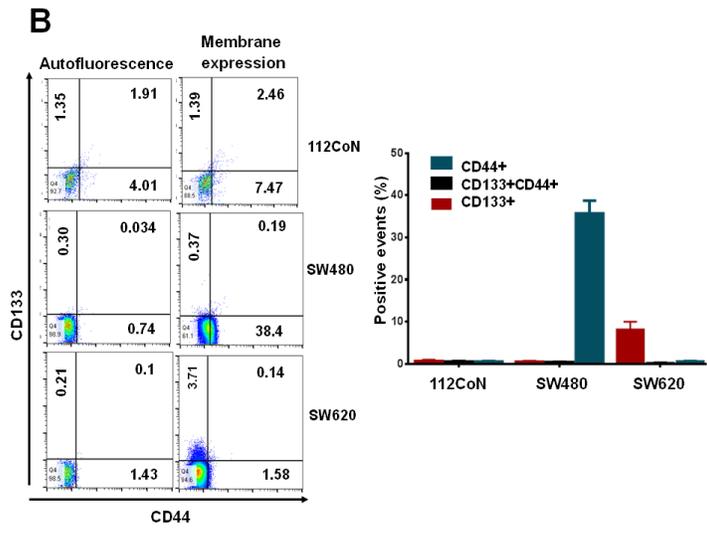
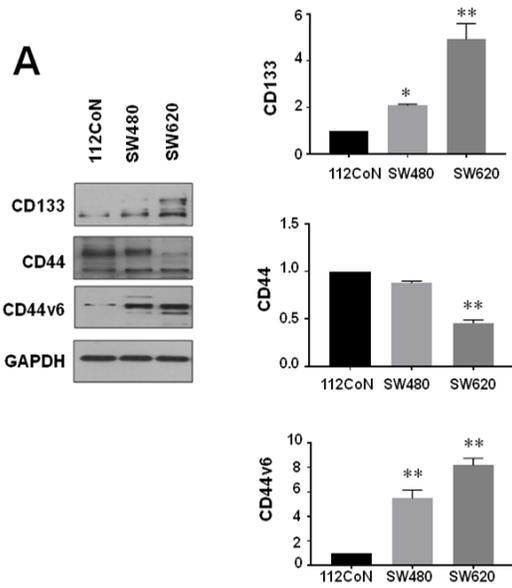
### **6.13 Análisis estadístico**

Los datos están expresados como la media +/- de SEM. Los análisis estadísticos se realizaron usando una prueba t de Student o una ANOVA de una vía con una prueba de comparación múltiple Tukey. El valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo estadísticamente. Se utilizó el programa GraphPad Prism 8.0 para analizar los datos.

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 Los perfiles de expresión de los marcadores de troncalidad celular en las células cancerosas colorrectales cambian durante la progresión del cáncer**

Se han descrito diversos marcadores de CSCs colorrectales a la fecha, incluyendo CD133, CD44, CD24, CD166 y Lgr-5; entre otros (Taniguchi et al., 2016; Kim et al., 2014). Se ha demostrado que la isoforma CD44v6 tiene un papel importante en la progresión, metástasis y pronóstico de CRC (Banky et al., 2012; Lv et al., 2015). Asimismo, CD44 y CD133 han sido ampliamente validados como marcadores de CSC en una variedad de tumores sólidos incluyendo CRC, por lo que fueron seleccionados en el presente estudio y su expresión fue examinada en células humanas cancerosas de colon. Como modelos celulares se eligió la línea SW480, proveniente de un caso de adenocarcinoma de CRC y su contraparte metastásica derivada SW620. Ambas expresan una versión trunca de APC, tienen la vía de señalización Wnt constitutivamente activa y son prototipos de células cancerosas de colon promovidas por KRAS. Los resultados provenientes de cada línea celular fueron comparados con la línea celular de colon no maligna 112CoN (Figura 10).



**Figura 10. Expresión de CD133, CD44 y CD44v6 en la línea celular normal (112CoN) y las líneas cancerosas de origen colorectal (SW480 y SW620).** A) WB mostrando la expresión de CD133, CD44 y CD44v6 en lisados totales de las líneas celulares. GAPDH se utilizó como control de carga. Los resultados son un representativo de al menos tres experimentos independientes usando preparaciones celulares. El análisis por densitometría de los niveles de expresión para cada marcador se muestra a la derecha y los datos representan la media +/- SEM de al menos 3 ensayos \*p = 0.01; \*\* = 0.001. B) Expresión membranar de las subpoblaciones CD133+, CD44+ y CD133+CD44+ en las células de las líneas celulares 112CoN, SW480 y SW620. Se muestra la adquisición de  $1 \times 10^4$  eventos. Los anticuerpos anti-CD44 acoplado a APC y anti CD133 acoplado a PE se utilizaron para la tinción de proteínas. Para la adquisición de muestras se utilizó el citómetro MoFlow. C) Expresión membranar de CD44v6 en las líneas celulares SW480 y SW620. Se muestra la adquisición de  $1 \times 10^4$  eventos. Los anticuerpos CD44v6 y un anticuerpo secundario anti-CD44v6 hecho en ratón acoplado a FITC se utilizaron para la tinción de proteínas. El citómetro FACScalibur se utilizó para adquirir las muestras.

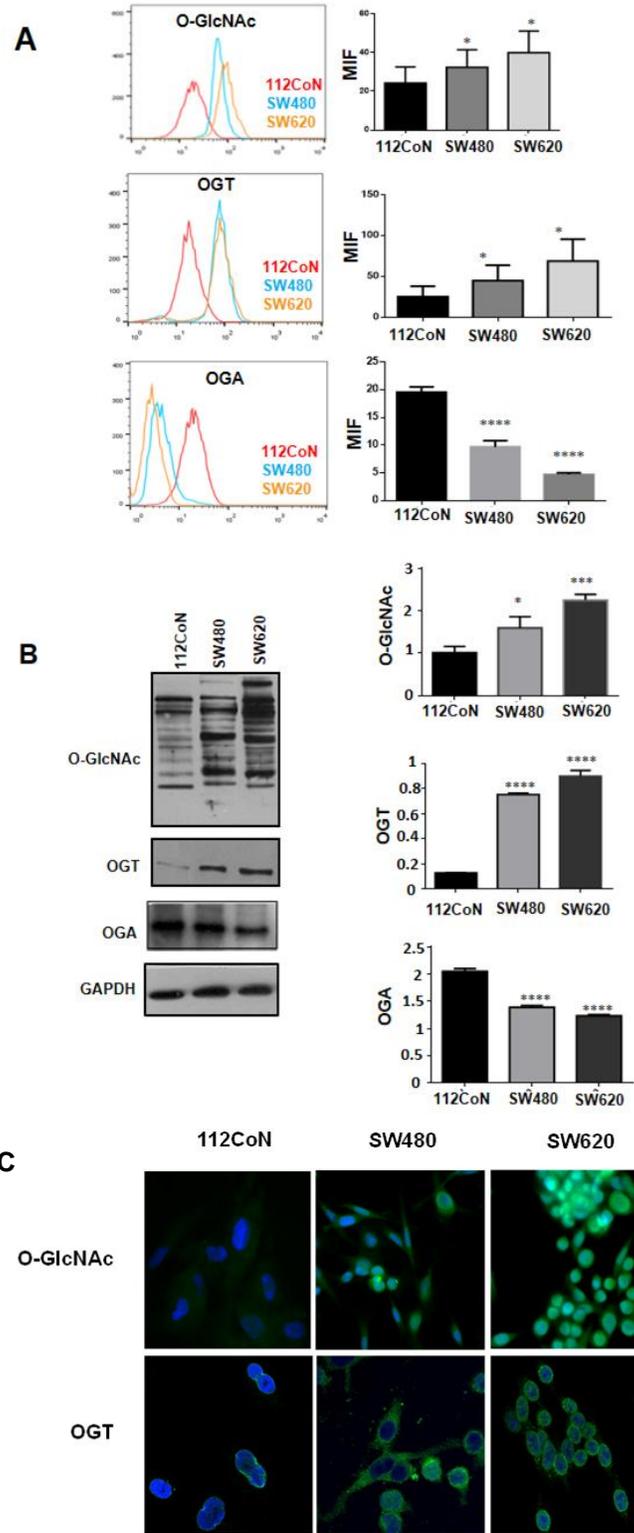
El análisis por WB de los extractos celulares totales mostrado en la Figura 10A, indicó que el marcador CD133, mostrado como un doblete, está enriquecido en las células metastásicas SW620; mientras que CD44, también en doblete, se expresa principalmente tanto en las células 112CoN y en las SW480 de cáncer primario. La isoforma de CD44, CD44v6 se expresa sólo en las células cancerosas. De forma interesante, al analizar la expresión membranar de estos marcadores de células troncales a través de citometría de flujo (Figura 10B/C), se observó que ni CD133 ni CD44 se expresan en la membrana de las células de colon no maligna. Además, se encontró que las células SW480 solo expresan CD44/CD44v6, pero no CD133 a nivel membranar. Esto puede explicarse debido a que se ha descrito anteriormente que el ligando principal de CD44 es HA, el cual está ampliamente expresado en la matriz extracelular; por lo que es de esperarse que las células de tumor primario expresen el marcador asociado a interacción con matriz extracelular (Zoller, 2011). Mientras que y de forma remarcable, las células SW620, derivadas de la metástasis del mismo tumor que las SW480, solo expresan CD133 y CD44v6, pero no CD44. Ya que existe evidencia creciente que demuestra que la expresión de CD133, está asociada a la quimioresistencia, relapso y metástasis distante en pacientes con

CRC; los resultados anteriores también sustentan la asociación del marcador de troncalidad CD133 con el fenotipo maligno celular canceroso (Wang et al., 2012; Zhao et al., 2016). Por otro lado, estos resultados sugieren que existe un cambio en el perfil de expresión de los marcadores de troncalidad durante la progresión de la malignidad. Más aún, aunque las células no malignas expresan CD44, este marcador no se encuentra en la membrana celular y cabe resaltar que del total de la expresión de CD44 expresado en la membrana de las células SW480 corresponde a CD44v6, la variante más relacionada con malignidad.

## **7.2 Las líneas celulares de CRC tienen un incremento en los niveles de O-GlcNAcilación en comparación con las células de colon no maligna y la perturbación de estos niveles incrementa la expresión de marcadores de troncalidad**

Previamente ya había sido descrito que los niveles de O-GlcNAcilación se encuentran incrementados en diversos tipos de cáncer, incluyendo CRC (Itkonen et al., 2016; Fardini et al., 2013). Para determinar los niveles de O-GlcNAcilación, la expresión de OGT y OGA en las células de CRC en comparación con las células no malignas de colon, se utilizaron ensayo de WB, inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo. Los resultados mostrados en Figura 11A (Citometría de flujo), Figura 11B (WB) y Figura 11C (inmunofluorescencia) claramente indican que, como se había reportado previamente, los niveles de O-GlcNAcilación son mayores en las células cancerosas en comparación con las no malignas. De forma consistente con lo anterior, las figuras 11A/B muestran como la expresión de OGT, la cual agrega O-GlcNAc, tiene un incremento mientras que OGA, la cual lo remueve, mostró una

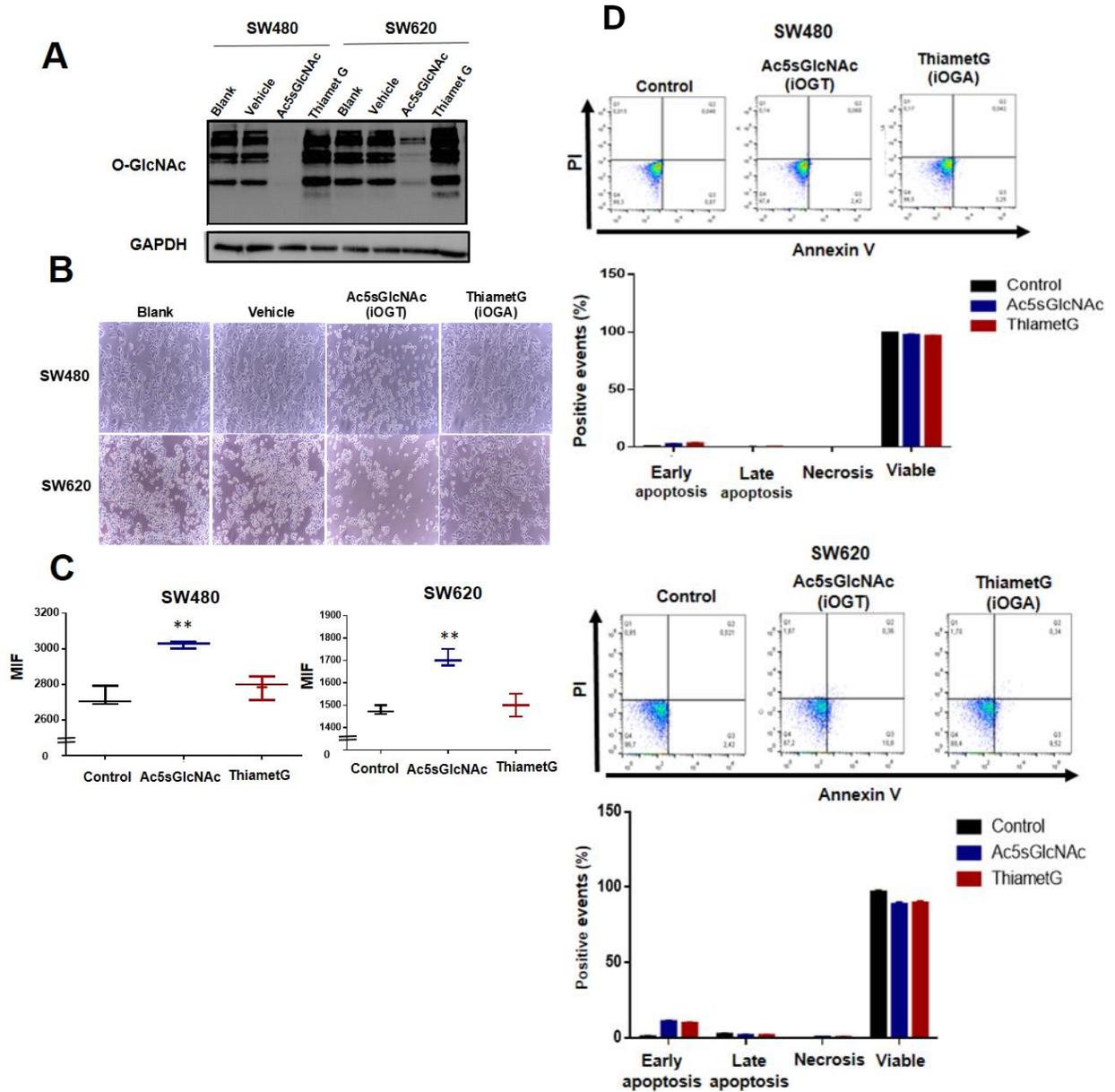
disminución en las células malignas al ser comparada con la expresión encontrada en las células no malignas.



**Figura 11. Los niveles de O-GlcNAcilación y la expresión de OGT son mayores en las líneas cancerosas en comparación con la línea normal de colon, mientras que la expresión de OGA se ve disminuida en las líneas malignas en comparación con las no-malignas.** A) Citometría de flujo. El análisis por densitometría de los niveles de expresión para cada marcador se muestra a la derecha y los datos representan la media +/- SEM de al menos 3 ensayos \*p = 0.01; \*\* = 0.001 comparadas con las células control 112CoN. B) Western blot de lisados totales. C) Inmunofluorescencias que muestran los niveles de expresión de O-GlcNAc, OGT y OGA en cada línea celular. Células normales: 112CoN; células cancerosas; SW480 y SW620.

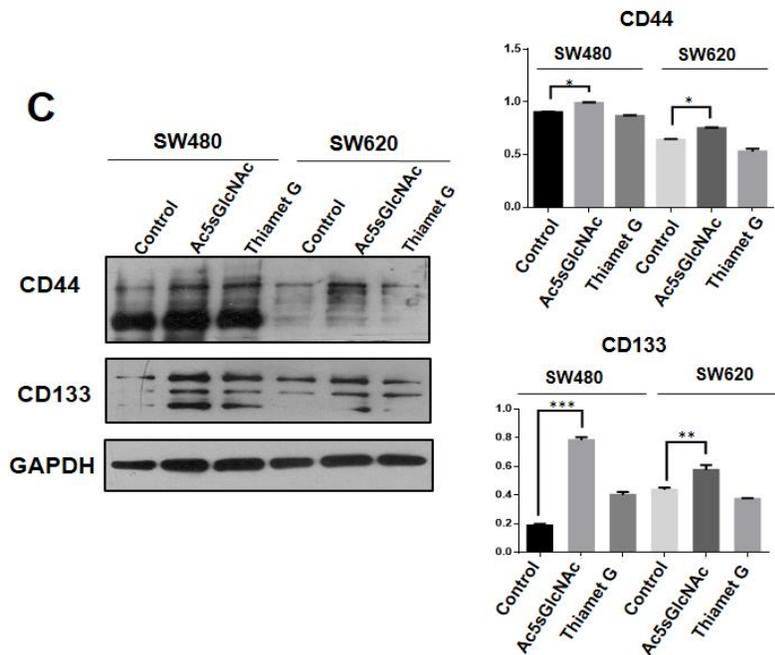
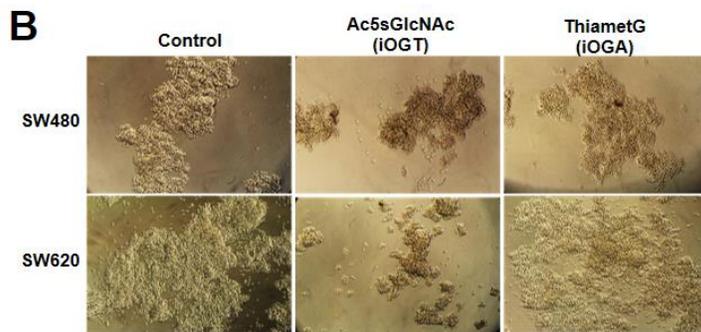
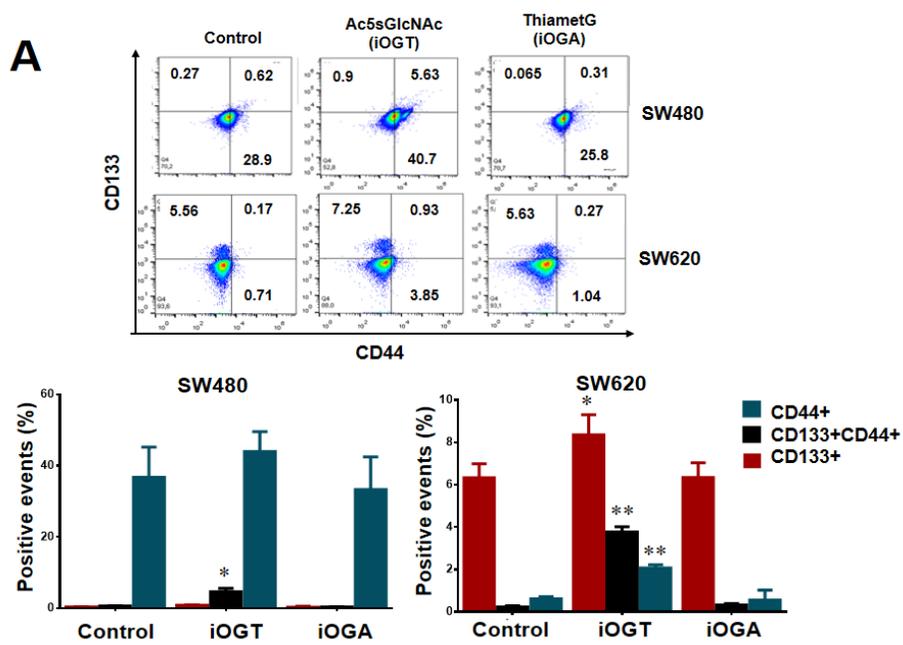
Posteriormente, se investigaron cuáles eran los efectos producidos por la perturbación de los niveles de O-GlcNAc sobre la expresión de los marcadores de troncalidad CD44 y CD133 mediante la inhibición farmacológica de OGT y OGA en las células de CRC. Primero, se examinó la efectividad del inhibidor de OGT por WB: se utilizó el inhibidor Ac5SGlcNAc (50  $\mu$ M) para disminuir los niveles de O-GlcNAc y el inhibidor de OGA, Thiamet-G (1  $\mu$ M) para incrementarlos. Como se observa en la Figura 12A, tal como se esperaba, la inhibición de OGA produjo una elevación global de los niveles de O-GlcNAcilación en ambas líneas celulares; mientras que la inhibición de OGT indujo una fuerte disminución en los niveles en comparación con los controles de las líneas celulares. En la Figura 12B se muestran las fotografías tomadas a las células después de 24 horas de incubación con los inhibidores; es interesante observar que en ambos tipos celulares la inhibición de OGT, pero no de OGA, produjo un cambio en la morfología y una disminución en la cantidad de células. Debido a que esta disminución en el número de células puede ser causado por una disminución en el rango de proliferación celular o por un incremento en la apoptosis, se analizó el impacto de las inhibiciones en ambos procesos. Los resultados presentados en la Figura 12C indican que la inhibición de OGT afecta de forma negativa la proliferación de las células SW480 y SW620,

efecto que ya se había reportado previamente en otros tipos de cáncer (Itkonen et al., 2016), incluyendo las células de CRC (Steenackers et al., 2016). La disminución en la proliferación se visualiza en la figura 12 como la retención del compuesto fluorescente CFSE en las células tratadas con Ac5sGlcNAc; mientras que en las células control o las tratadas con Thiamet-G, la señal fluorescente disminuye con cada ciclo de división celular. Además, se encontró que ninguno de los tratamientos con los inhibidores afectó de forma significativa el rango de apoptosis de ambos tipos celulares, como se muestra en la Figura 12D.



**Figura 12. Efectos de la inhibición de OGT y OGA en los rangos de proliferación y apoptosis de las células SW480 y SW620.** Las células fueron incubadas durante 24 h en ausencia (vehículo) o presencia de 50  $\mu$ M de Ac5sGlcNAc para disminuir los niveles de O-GlcNAc; o en presencia de 1  $\mu$ M de Thiamet-G para incrementar los niveles. A) Western blot que muestra la efectividad de los inhibidores en los niveles de O-GlcNAc celulares. B) Después de 24 horas de inhibición se tomaron fotografías con aumento 40X. C) Ensayos de proliferación usando CellTrace CFSE por citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 ensayos \* $p$  = 0.01; \*\* = 0.001. D) La muerte celular fue evaluada con el Kit de detección de apoptosis Anexina V-FITC. Los diagramas de puntos muestran la muerte celular temprana, tardía, necrosis o las células viables. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 ensayos.

Posteriormente se evaluaron los efectos de la modificación de los niveles de O-GlcNAc en la expresión de los marcadores de CSCs mediante citometría de flujo. Los resultados presentados en la Figura 13A claramente indican que la inhibición de OGA no afectó los perfiles de expresión de los marcadores de CSCs CD44 y CD133 ni en células SW480 ni en las células SW620, en comparación con las células control sin tratamiento. Sin embargo, y de forma contrastante, la inhibición de OGT en la línea celular metastásica SW620 indujo la expresión de CD44 e incrementó la expresión de CD133. Además, enfatizando, la inhibición de OGT indujo la aparición de una subpoblación doble positiva CD44+/CD133+ tanto en las células de tumor primario SW480 y en la línea metastásica SW620. Por lo que, estos resultados sugieren que la inhibición de OGT incrementa la troncalidad de las células de CRC. De forma consistente, al incubar tanto los controles como las células tratadas con los inhibidores en los ensayos de formación de esferoides y de actividad clonogénica, solo las células SW480 o SW620 tratadas con Ac5sGlcNAc formaron esferoides bien definidos y condensados, como se observa en Figura 13B; así mismo, la actividad de clonogénica solo se incrementó en las células donde OGT estaba inhibida, lo que puede observarse en la Figura 13C. Además, el análisis de la expresión de los marcadores CD44 y CD133 mediante WB en las células SW480 y SW620 tratadas mostró un aumento significativo de la expresión de CD44 y CD133 solo en las células donde se inhibió OGT en comparación con las células donde OGA fue inhibida y con las células control (Figura 13D).



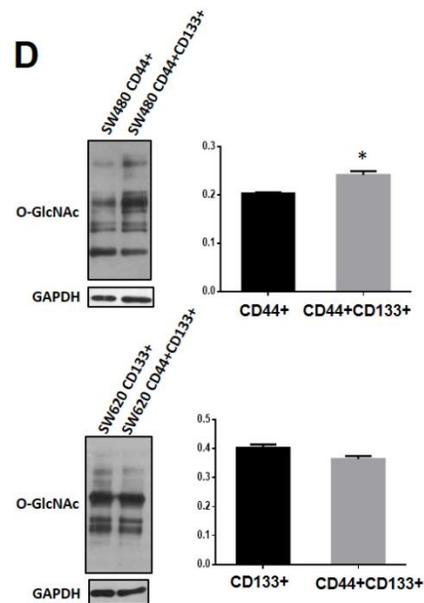
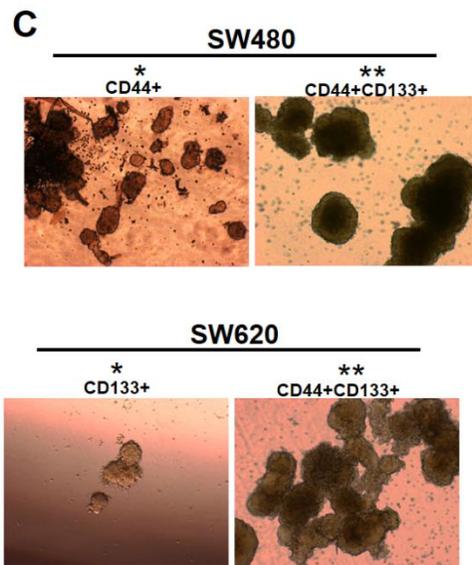
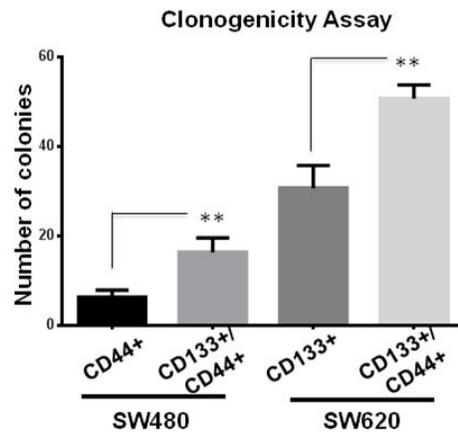
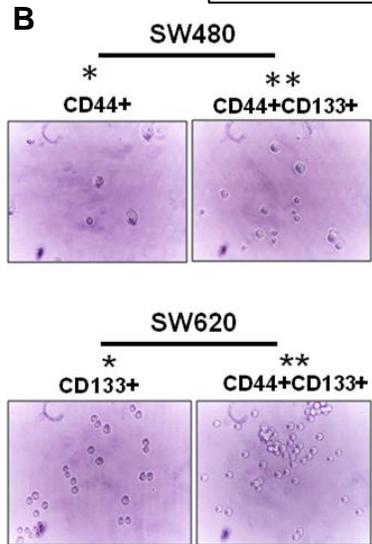
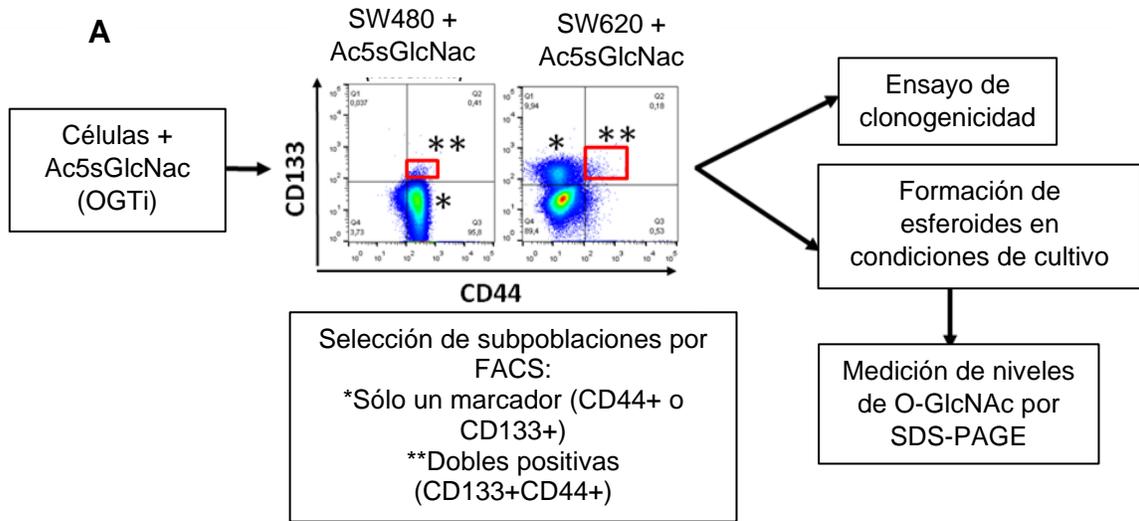
**Figura 13. La inhibición de OGT promueve cambios en la expresión de los marcadores de troncalidad, CD133 y CD44.** Las células fueron incubadas durante 24 h en ausencia (DMSO como vehículo) o presencia de 50  $\mu$ M de Ac5sGlcNAc para disminuir los niveles de O-GlcNAc; o en presencia de 1 $\mu$ M de Thiamet-G para incrementar los niveles. A) Después de 24 horas de exhibición, la expresión de las subpoblaciones CD44+, CD133+ y CDCD44+CD133+ se evaluó mediante citometría de flujo, los datos representan la media +/- SEM de al menos 3 ensayos independientes. \*p = 0.01; \*\* p = 0.001 comparadas con el control. B) Cultivo de esferoides. Las poblaciones totales fueron cultivadas en placas de ultra baja adherencia con medio suplementado con EGF y B27. Después de 2 semanas de incubación, se tomaron fotos de las esferas formadas. C) Ensayos de clonogenicidad. Las células fueron cultivadas en medio DMEM F12 con ITS en ausencia o presencia de los inhibidores de OGT o OGA para evaluar la formación de colonias. Las barras en las gráficas representan la media +/- SEM de tres experimentos diferentes. D) Western blot de lisados totales mostrando la expresión de CD133 y CD44 en los cultivos de esferoides. Como control de carga se utilizó GAPDH. Los resultados muestran un representativo de al menos tres experimentos independientes usando preparaciones celulares diferentes. Se muestra el análisis de densitometría de la expresión de los niveles de cada marcador a la derecha y los datos representan la media +/- SEM de al menos 3 ensayos independientes. \*p = 0.01; \*\*p = 0.05, \* \*\* p = 0.001 (ensayo de t de Student) comparadas con el control.

### **7.3 Las subpoblaciones doble positivas CD44+/CD133+, inducidas como resultado de la inhibición de OGT, poseen un fenotipo más agresivo evaluado mediante el incremento en la clonogenicidad y la formación de esferoides en cultivos 3D**

Previamente las subpoblaciones doble positivas CD44/CD133 han sido encontradas en diversos tumores altamente metastásico como hígado, páncreas, vejiga y colon. En CRC, esta subpoblación fue aislada e indujo la formación de tumores en ratones inmunocomprometidos en comparación con el mismo número de células que expresaron sólo un marcador (CD133+/CD44-), las cuales no lograron formar tumor, indicando que CD44 provee de un mejor enriquecimiento de características de CSCs a la subpoblación CD133+ (Haraguchi et al., 2008). Del mismo modo, esta subpoblación CD133+CD44+ también ha sido caracterizada en diversos tumores altamente metastásicos; en pacientes con CRC con metástasis temprana de hígado, la co-expresión de CD133 y CD44 es significativamente mayor que en los

casos sin metástasis (Huang et al., 2012). Por lo tanto, se decidió profundizar y averiguar si en este caso, el evento también correlaciona con un cambio a un fenotipo maligno más agresivo. Con este objetivo, se analizaron las características típicas que exhiben las CSCs, como la habilidad de formación de esferoides y la clonogenicidad, en las subpoblaciones CD133/CD44 en comparación con las poblaciones con solo un marcador obtenidas como resultado de la inhibición de OGT. Tal como se representa en la Figura 14A, las subpoblaciones de células troncales encontradas en cada línea celular después de la incubación con el inhibidor de OGT fueron aisladas mediante FACS y cultivadas para los ensayos de clonogenicidad y formación de esferoides en cultivos 3D. Los resultados presentados en la Figura 14B muestran que, como se esperaba, las células SW620 derivada de metástasis, claramente formaron más colonias que las células de tumor primario SW480. De forma interesante, al comparar la subpoblación con un solo marcador y la subpoblación doble positiva de cada línea celular, esta última exhibió mayor habilidad de clonogenicidad, indicando el desarrollo de un fenotipo maligno más agresivo (Figura 14B). También se llevaron a cabo cultivos en 3D con medio selectivo para inducir la formación de colonoesferas, y como se muestra en la figura 14C, ambas subpoblaciones ya sea en las células SW480 o SW620 tuvieron la habilidad de formar esferoides en el medio selectivo. Sin embargo, las subpoblaciones dobles positivas de células troncales en ambos tipos celulares formaron esferoides más grandes y condensados comparados con las subpoblaciones que expresan un solo marcador particularmente en la línea metastásica SW620. Finalmente, la evaluación de los niveles de O-GlcNAcilación en las subpoblaciones de células troncales derivadas de las células SW480 y

SW620 derivadas de la inhibición con OGT mostraron que aunque la subpoblación doble positiva de SW480 mostró niveles más altos de O-GlcNAc comparadas con sus contrapartes de un solo marcador, no hubo un cambio significativo en los niveles de O-GlcNAc encontrados en la población doble positiva de las células SW620 en comparación con las células troncales positivas con un solo marcador. Aunque debe tomarse en consideración que después de la exposición de condiciones de estrés y cuando las células se adaptan a las condiciones de crecimiento, los niveles de O-GlcNAc se recuperan (Figura 14D).

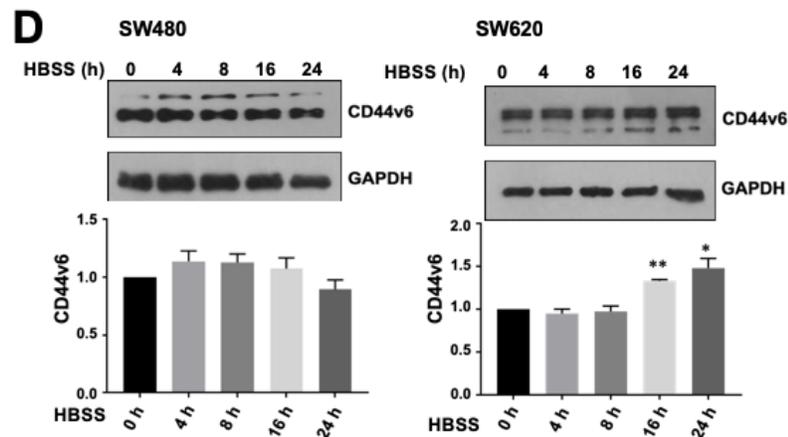
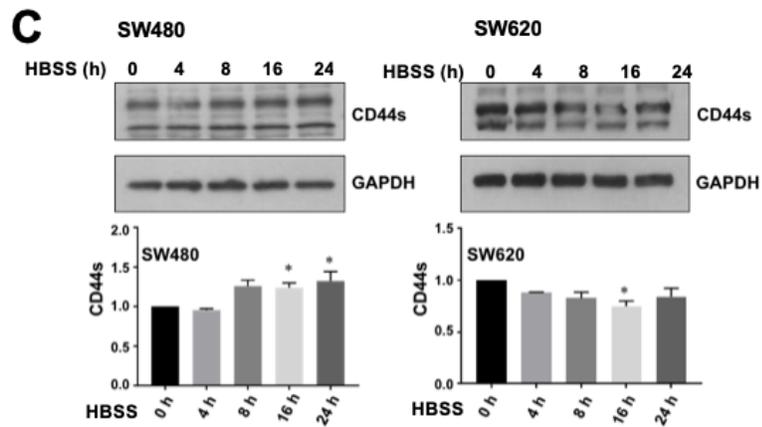
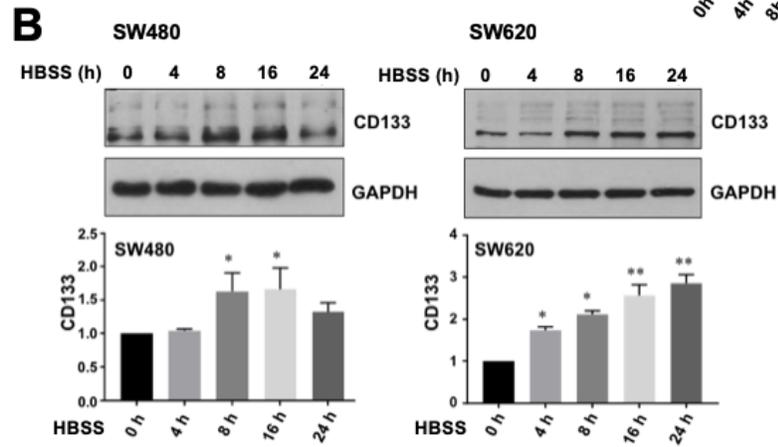
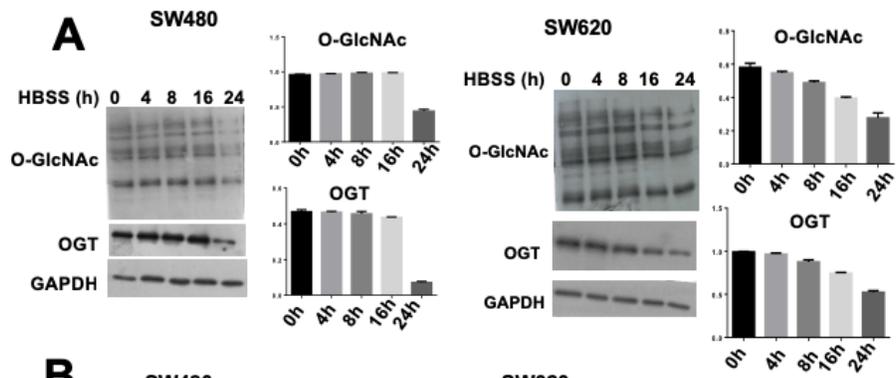


**Figura 14. Las subpoblaciones dobles positivas CD133+/CD44 inducidas como resultado de la inhibición de OGT muestran un fenotipo más agresivo en comparación con las subpoblaciones que expresan solo un marcador.** A) Esquematización de la técnica experimental usada. B) Ensayos de clonogenicidad. Se llevó a cabo el aislamiento por FACS de las subpoblaciones sencillas o dobles positivas; las células aisladas fueron cultivadas y crecidas en diferentes condiciones de cultivo. Las células doble positivas se cultivaron en medio DMEM F12 con ITS para evaluar la formación de colonias. Las barras en las gráficas representan la media +/- SEM de tres experimentos diferentes. \*p = 0.01; \*\*p = 0.05, \*\*\* p = 0.001 (ensayo de t de Student) comparadas con el control. C) Cultivo de esferoides. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de ultra baja adherencia con medio suplementado con EGF y B27. Después de 3 semanas de incubación, se tomaron fotos de las esferas formadas. Para compararlas, las células que expresan un solo marcador (CD44 para SW480 y CD133 para SW620) fueron cultivadas bajo las mismas condiciones de cultivo. Los esferoides fueron lisados y se evaluaron los niveles de expresión de O-GlcNAc por WB. El aislamiento de las células por FACS se llevó a cabo en un citómetro MoFlow. D) Los esferoides fueron lisados y los niveles de O-GlcNAc fueron evaluados por WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. Los resultados muestran un representativo de al menos tres experimentos independientes usando preparaciones celulares diferentes. El análisis de densitometría de la expresión de los niveles de los niveles de O-GlcNAc se muestra a la derecha y los datos representan la media +/- SEM de al menos 3 ensayos independientes. \*p = 0.01 (Prueba T) en comparación con los esferoides que expresan solo un marcador.

#### **7.4 El estrés nutricional induce efectos similares a los observados durante la inhibición de OGT en la expresión de marcadores de troncalidad en células cancerosas**

Se encontró que la inhibición de OGT en las células cancerosas de tumor primario y metastásico indujo no sólo un incremento en la expresión de marcadores de troncalidad, sino también la aparición de subpoblaciones doble positivas para marcadores de troncalidad que exhiben un fenotipo más agresivo. Evidencia experimental ha mostrado que las señales de estrés en el microambiente tumoral conllevan a la plasticidad fenotípica, invasión y determinan el resultado terapéutico de los pacientes. El estrés nutricional, particularmente la privación de glucosa, puede disminuir la disponibilidad de UDP-GlcNAc y como consecuencia, también los niveles intracelulares de O-GlcNAc. Con este fin, el medio de cultivo de las células SW480 y SW620 fue reemplazado con solución HBSS durante diferentes

periodos de tiempo; 4, 8, 16 o 24 horas (Figura 15). Las células se colectaron en estos diferentes puntos para evaluar los niveles de O-GlcNAcilación, la expresión de OGT y la expresión de los marcadores de troncalidad por WB. Los resultados presentados en la Figura 15A muestran que, en concordancia con la hipótesis, la exposición de las células SW480 y SW620 a un estrés nutricional agudo mimetiza la inhibición de OGT, dado que los niveles de O-GlcNAcilación y los niveles de expresión de OGT fueron reducidos en una manera dependiente del tiempo, siendo las 16 y 24 horas de incubación de las células en HBSS donde se encontró la mayor disminución. Además, los resultados presentados en la figura 15B (expresión de CD133), 15C (expresión de CD44) y 15D (expresión de CD44v6), muestran que el estrés nutricional indujo un incremento general en la expresión de los marcadores de troncalidad en ambos tipos celulares comparados con los controles (tiempo 0); lo que fue significativo después de 8 h de ayuno. Cabe recordar que, bajo condiciones normales de cultivo, las células SW480 no expresan el marcador CD133 (mostrado previamente en la Figura 10). Pero, al ser expuestas a condiciones de estrés nutricional, la expresión de CD133 se induce y también se incrementa la expresión de CD44/CD44v6; de una forma similar a cuando OGT es inhibida farmacológicamente. Por lo anterior, los resultados sugieren que el ayuno incrementa la expresión de marcadores de troncalidad, apoyando la idea de que la actividad de OGT está integrada estrechamente con el estado nutricional de la célula y, además, parece que el incremento de los niveles de O-GlcNAc es parte de la respuesta a estrés endógena que es ligada a la supervivencia celular.



**Figura 15. El estrés nutricional mimetiza los efectos de la inhibición de OGT en la expresión de marcadores de troncalidad.** El medio de cultivo de las células SW480 y SW620 fue reemplazada por HBSS durante 4, 8, 16 o 24 horas. Las células fueron colectadas en los distintos puntos y se midieron los niveles de O-GlcNAc, la expresión de OGT, así como la expresión de los marcadores de células troncales por WB. A) Los niveles de O-GlcNAc y OGT disminuyen de forma dependiente del tiempo durante la incubación de las células en HBSS. Los resultados obtenidos para la expresión de CD133 se muestran en el panel B, la expresión de CD44 en el panel C y de CD44v6 en el panel D. Los resultados en las gráficas representan la media +/- SEM de tres experimentos independientes. \*p = 0.01; \*\* p = 0.001 (ensayo de t de Student) comparadas con el control.

## 8 DISCUSIÓN

La presencia de las subpoblaciones de CSCs ha sido identificada en casi todos los tipos de cáncer. Como ya se mencionó anteriormente, la proteína CD133 ha sido utilizada ampliamente como biomarcador para identificar y aislar células troncales a partir de tejidos cancerosos, incluyendo la mucosa colorrectal. La presencia de células CD133+ ha sido asociada con el fenotipo maligno en diversos tipos de tumores, incluyendo CRC. Consistente con lo anterior, se ha reportado que la subpoblación CD133+ es más grande en los tumores de metástasis de hígado que en los primarios en CRC (Li, 2013). Además, se ha demostrado que las células CD133+ muestran un alto grado de quimioresistencia (Zhang et al., 2010; Angelastro and Lame, 2010). De forma interesante, en el presente trabajo, se encontró que, bajo condiciones de cultivo normales, las células SW480 expresaron el marcador CD44 y no el CD133 en membrana celular; mientras que la línea derivada metastásica del mismo tumor SW620 expresa principalmente CD133.

Diversos autores han reportado que CD44 también se expresa comúnmente en las CSCs tumorales, y se ha descrito que participa en una variedad de funciones biológicas como adhesión celular, migración tumoral, crecimiento, diferenciación, supervivencia y quimioresistencia (Banky et al., 2012). La forma estándar de CD44

es la isoforma más pequeña codificada por 10 exones, sin los productos de los exones adicionales; mientras que las variantes son isoformas que expresan segmentos adicionales (v2-v10) en el dominio extracelular, los cuales son generados por splicing alternativo. Tanto la forma estándar como las variantes pueden ser reconocidas por los anticuerpos dirigidos contra la región estándar, pero de forma importante, la expresión de las variantes solo ha sido encontrada en las células cancerosas y se producen durante la progresión tumoral. Por lo tanto, diferentes células de un tumor pueden expresar varios y posiblemente diferentes grupos de isoformas de CD44. En CRC, la isoforma v6 es frecuentemente asociada con el fenotipo metastásico en la literatura y recientemente se ha asociado con la adquisición de la resistencia a fármacos (Lv et al., 2015). De acuerdo con lo anterior, mientras que el epitelio glandular del intestino grueso expresa la forma estándar pero no las variantes; los adenomas colorrectales altamente displásicos, el CRC primario y el metastásico expresan las isoformas de CD44. Por lo que los resultados presentados apoyan la noción de que la expresión de las variantes está asociada con la malignidad, ya que se encontró que las células normales de la línea 112CoN expresan CD44, pero no CD44v6, la cual solo se halló en las células malignas de colon.

En este estudio se mostró que, en las células cancerosas, la inhibición de OGT indujo la aparición de una subpoblación doble positiva CD133+/CD44+ de CSCs. En concordancia con los resultados, estas células cancerosas CD133+/CD44+ han sido caracterizadas en diversos tumores altamente metastásicos como CRC (Chen et al., 2011b; Huang et al., 2012; Bellizzi et al., 2013), hígado (Hou et al., 2012) y

carcinoma de vesícula (Shi et al., 2010b). También se ha reportado que, en CRC con metástasis temprana de hígado, la co-expresión de CD133 y CD44 es significativamente más alta en comparación con los casos sin metástasis de hígado (Huang et al., 2012).

Las funciones que desempeña la O-GlcNAcilación en las células troncales y la pluripotencia han sido poco descritas y permanecen sin ser totalmente clarificadas. En este aspecto, Jang et al. mostró que el bloqueo de OGT mediante su knockdown reduce el potencial de autorrenovación en las ESC, mientras que el incremento global de los niveles de O-GlcNAcilación inhibió la diferenciación normal (Jang et al., 2012). Otros autores han mostrado que O-GlcNac se requiere para la supervivencia de ESC y que el knockout de OGT en ratones mostró letalidad embrionaria (Shafi et al., 2000). Además, se ha revelado a través de evidencia experimental que O-GlcNAc controla la pluripotencia al regular directamente la actividad transcripcional de los componentes nucleares de la red de pluripotencia; por ejemplo, se ha mostrado en diversos factores de troncalidad celular como OCT4 y SOX2. Mientras que el rol de la O-GlcNAcilación de SOX aún no es totalmente claro, se ha descrito que OCT4 y OGT interactúan y se modifican para regular la pluripotencia de la red genética (Pardo et al., 2010).

En este trabajo se investigaron los efectos producidos por la modificación de los niveles de O-GlcNAc en la expresión de los marcadores de troncalidad CD44 y CD133 mediante la inhibición farmacológica de OGT u OGA, las enzimas que catalizan la adición o remoción de O-GlcNAc, respectivamente. Además, no solo fue confirmado que O-GlcNAc funciona como un sensor nutricional y que la actividad

de OGT está estrechamente integrada con el estado nutricional de la célula, como se reportó previamente en otros sistemas celulares; sino también que los niveles incrementados de O-GlcNAc son parte de la respuesta endógena al estrés que está ligada a su vez a la supervivencia celular. Con respecto a la anterior, evidencia experimental ha mostrado que la O-GlcNAcilación funciona como un sensor nutricional que asocia el estatus metabólico de la glucosa con la regulación celular de la transducción de señales, transcripción, función proteica y diferenciación (Olivier-Van Stichelen and Hanover, 2015; Sharma et al., 2018). Como se mencionó anteriormente, en células cancerosas, el metabolismo está dramáticamente alterado en comparación con las células normales; las células cancerosas reprograman su metabolismo para experimentar una tasa incrementada de glucólisis y fermentación de ácido láctico, aún bajo condiciones de normoxia [efecto Warburg (Warburg, 1956)]. Una consecuencia de estos cambios metabólicos es el incremento de la ingesta celular de la glutamina, que a su vez, incrementa el flujo a través de HBP. Ya que HBP requiere glucosa, glutamina, ácidos grasos y UTP, integra la información de la disponibilidad de nutrientes en la célula. De forma importante, HBP produce el donador de energía UDP-GlcNAc, el cual es el donador involucrado en la síntesis de nucleótidos, glicosilación compleja y también es utilizado por OGT para modificar proteínas blanco (Itkonen et al., 2016).

La expresión incrementada de OGT se ha detectado en diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de vejiga (Rozanski et al., 2012), cáncer de pulmón y CRC. En este trabajo fue confirmado que OGT está sobreexpresada en las células cancerosas en comparación con las no malignas, y se mostró que la disminución de los niveles

de O-GlcNAc, a través de la inhibición farmacológica de OGT, indujo la aparición de una pequeña subpoblación CD44+/CD133+ con un fenotipo más agresivo. Aunque al analizar los niveles de O-GlcNAc en las células doble positivas de la línea SW620, se encontró que exhibieron niveles menores de O-GlcNAc comparados con sus contrapartes que solo expresan un marcador; mientras que la subpoblación doble positiva de las células SW480 mostró niveles mayores en comparación con la subpoblación con un solo marcador. Pero debe tomarse en consideración que los niveles de O-GlcNAc examinados en los esferoides derivados de las células troncales dobles positivas fueron obtenidos 3 semanas después de los cultivos 3D. Por lo que se esperaba una disminución en los niveles de O-GlcNAc solo como el resultado del ayuno o si la glucosa fuera retirada de las células tumorales, pero una vez que estas se adaptan a las condiciones de cultivo, los niveles de O-GlcNAc se recuperan como resultado de su metabolismo. Sin embargo, es interesante notar que estos niveles fueron menores en las células metastásicas SW620 en comparación con las células del tumor primario SW480 de las que derivan. Ya que se espera una disminución en los niveles de O-GlcNAc si la glucosa es retirada, se hipotetizó que la exposición de las células a un estrés nutricional agudo podría mimetizar los efectos producidos por la inhibición de OGT. De hecho, los resultados presentados confirmaron que el ayuno incrementa la expresión de los marcadores de troncalidad, reafirmando la noción de que la vía HBP y la actividad de OGT están íntimamente integradas con el estado nutricional de la célula y contribuye a regular el mantenimiento de la troncalidad.

En este trabajo se encontró que el incremento de los niveles de O-GlcNAc observado en las células de CRC parece ser parte de la respuesta endógena a estrés nutricional la cual está ligada a la supervivencia celular. En este aspecto, los datos son consistentes con la noción de que la modificación por O-GlcNAc de proteínas es una vía de señalización modulada metabólicamente que regula la función celular y tiene un papel particularmente crítico en mediar la respuesta de las células al estrés (Chatham and Marchase, 2010). Evidencia de lo anterior fue reportada en 2004 por Zachara et al., cuando se mostró que los niveles de O-GlcNAc incrementan la respuesta a diversos arreglos de estímulos de estrés y la inhibición de esta respuesta produjo una reducción en la supervivencia celular (Zachara et al., 2004). Otros autores también mostraron que los niveles de O-GlcNAc se incrementan en respuesta al estrés, este aumento atribuye un incremento a la tolerancia al estrés; además el aumento agudo de esta respuesta es citoprotectora, incluso en el sistema cardiovascular (Liu et al., 2006). Por lo tanto, los datos del presente trabajo apoyan a la propuesta de que la modificación por O-GlcNAc de proteínas no solo funciona como un sensor del estado nutricional el cual tiene un papel crítico en el mantenimiento de la troncalidad, sino que también es un importante mediador de la respuesta celular a condiciones de estrés.

## 9 CONCLUSIONES

- La inhibición de OGT y la consecuente disminución de los niveles de O-GlcNAc, altera la expresión de marcadores de troncalidad e induce la aparición de una subpoblación agresiva doble-positiva CD133+/CD44+. La co-expresión de ambos marcadores ha sido encontrada y caracterizada en tumores de CRC altamente metastásicos.
- La exposición de las células cancerosas a estrés nutricional agudo mimetiza el efecto de la inhibición de OGT, lo cual confirma que O-GlcNAc funciona como sensor nutricional y que la actividad de OGT está altamente integrada con el estatus nutricional de la célula.
- La vía metabólica HBP/O-GlcNAc regula la función celular y juega un papel crítico al mediar la respuesta celular a estrés.
- O-GlcNAc se asocia con desarrollo maligno de las CSCs, por lo que puede su alteración puede asociarse con los sellos distintivos del cáncer.

## 10. ARTÍCULOS PUBLICADOS DERIVADOS DE ESTA TESIS



# O-GlcNAcylation Is Involved in the Regulation of Stem Cell Markers Expression in Colon Cancer Cells

Gabriela Fuentes-García<sup>1</sup>, M. Cristina Castañeda-Patlán<sup>1</sup>,  
Anne-Sophie Vercoutter-Edouart<sup>2</sup>, Tony Lefebvre<sup>2</sup> and Martha Robles-Flores<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico,

<sup>2</sup>Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS, UMR 8576, University of Lille, Lille, France

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Yehiel Zick,

Weizmann Institute of Science, Israel

#### Reviewed by:

Hai-Bin Ruan,

Medical School - University of

Minnesota, United States

Edgar Zenteno,

National Autonomous University of

Mexico, Mexico

Mauricio Reginato,

College of Medicine, Drexel University,

United States

#### \*Correspondence:

Martha Robles-Flores

mrobes@unam.mx

#### Specialty section:

This article was submitted to

Molecular and Structural

Endocrinology,

a section of the journal

Frontiers in Endocrinology

Received: 28 September 2018

Accepted: 23 April 2019

Published: 08 May 2019

#### Citation:

Fuentes-García G,

Castañeda-Patlán MC,

Vercoutter-Edouart A-S, Lefebvre T

and Robles-Flores M (2019)

O-GlcNAcylation Is Involved in the

Regulation of Stem Cell Markers

Expression in Colon Cancer Cells.

Front. Endocrinol. 10:289.

doi: 10.3389/fendo.2019.00289

The dynamic O-linked-N-acetylglucosamine posttranslational modification of nucleocytoplasmic proteins has emerged as a key regulator of diverse cellular processes including several hallmarks of cancer. However, the role played by this modification in the establishment of CSC phenotype has been poorly studied so far and remains unclear. In this study we confirmed the previous reports showing that colon cancer cells exhibit higher O-GlcNAc basal levels than non-malignant cells, and investigated the role played by O-GlcNAcylation in the regulation of CSC phenotype. We found that the modification of O-GlcNAcylation levels by pharmacological inhibition of the O-GlcNAc-transferase enzyme that adds O-GlcNAc (OGT), but not of the enzyme that removes it (OGA), increased the expression of all stem cell markers tested in our colon malignant cell lines, and induced the appearance of a double positive (CD44+/CD133+) small stem cell-like subpopulation (which corresponded to 1–10%) that displayed very aggressive malignant phenotype such as increased clonogenicity and spheroid formation abilities in 3D culture. We reasoned that OGT inhibition would mimic in the tumor the presence of severe nutritional stress, and indeed, we demonstrated that nutritional stress reproduced in colon cancer cells the effects obtained with OGT inhibition. Thus, our data strongly suggests that stemness is regulated by HBP/O-GlcNAcylation nutrient sensing pathway, and that O-GlcNAc nutrient sensor represents an important survival mechanism in cancer cells under nutritional stressful conditions.

**Keywords:** colon cancer, O-GlcNAc, cancer stem cells, stemness, OGT, OGA

## INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is one of the most prevalent cancers and is a leading cause of cancer mortality worldwide. It is well-known that tumors are formed by different cells, and that among them, the cancer stem cell (CSC) subpopulation are proposed to be responsible for tumor initiation, drug and radiation resistance, invasive growth, metastasis, and tumor relapse (1). Several colorectal CSC markers have been reported to date, including CD133, CD44, CD24, CD166, and leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (LGR5) (1, 2). In addition, the CD44 isoform containing variant exon v6 (CD44v6) has been reported to play an important role in the progression, metastasis, and prognosis of CRC (3, 4).

O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) protein modification has emerged as a critical regulator of diverse cellular processes, but its role in stem cells (SCs) and pluripotency has been poorly investigated so far and remains unclear. In this respect, several studies have suggested that O-GlcNAcylation promotes SC maintenance, and decrease in O-GlcNAcylation may be required for SC differentiation (5). Surprisingly, this highly dynamic modification of proteins is regulated only by two enzymes: the O-GlcNAc transferase (OGT), which adds the residue and the O-GlcNAcase (OGA), which removes it. Increased OGT activity has been shown to contribute to maintenance of stemness and to prevent differentiation to specific tissue types (6, 7). In addition, it has also been reported that increased OGT activity affects transcriptional activity of Sox2 and Oct4 SC marker proteins to maintain genomic stability, thereby maintaining self-renewal (5, 8).

Growth and proliferation of cancer cells tightly depend on their nutritional environment, particularly on glucose availability. It is well-known that SCs originating in hypoxic niches reprogram their metabolism from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis to increase glycolytic activity even in the presence of oxygen (Warburg effect). Glutamine is also taken up actively in embryonic SCs (9). However, even though the contribution of the metabolic and nutrient sensing pathways to stemness maintenance is recognized, there is very little understanding of the molecular mechanisms that link stemness to the nutrient-sensing pathways (7). However, among these, the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) is probably most relevant. This pathway, which is triggered by increased glucose uptake, is helpful in biosensing glucose and routing it through a shunt pathway to make UDP-N-Acetyl glucosamine (UDP-GlcNAc) which is utilized for O-GlcNAc modification of cytosolic, nuclear and mitochondrial proteins (7). In this respect, it is well-known that O-GlcNAcylation adjusts protein function according to the nutritional status of the cell. Remarkably, increased glucose uptake has been demonstrated that leads to increased OGT activity (7, 8), and may be instrumental in regulating self-renewal not only in embryonic and hematopoietic SCs but also in CSCs. In this study we investigated the role played by O-GlcNAcylation in the establishment of CSC cell phenotype. Our data indicate that stemness is regulated by HBP/O-GlcNAcylation nutrient sensing pathway, and that O-GlcNAc nutrient sensor represents an important survival mechanism in cancer cells under nutritional stressful conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents and Antibodies

The following antibodies were used in the experiments: allophycocyanin (APC)-conjugated mouse anti-CD44 from BD Biosciences, phycoerythrin (PE)-conjugated mouse anti-CD133 from Miltenyi Biotec, rabbit anti-CD44, rabbit anti-CD133, and mouse anti-OGT from Abcam, Alexa 647-conjugated rabbit anti-mouse from Invitrogen; rabbit anti- $\beta$ -tubulin from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit from Molecular Probes, Inc., (Eugene, OR, USA),

mouse anti-O-GlcNAc (RL2) from Thermo Fisher Scientific; mouse anti-GAPDH from Santa Cruz Biotechnology Inc (Sta. Cruz, CA, USA).

### Cell Lines

Primary SW480 and its derivative metastatic SW620 colorectal cell lines, express a truncated version of APC (Adenomatous polyposis coli), have constitutively active Wnt signaling and are prototype of KRAS-driven cancer cells (KRAS G12V, APC A1457T/K1462R, FGFR3 S400R, TP53 R273H, and STK11 G58S mutations) (10). These cancer cell lines and the non-malignant 112CoN colon cell line used here were purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) and were authenticated in June 2017 by Short Tandem Repeat DNA profiling performed at the Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) in Mexico City.

### Cell Culture

112CoN cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), antibiotics (120 mg/ml penicillin and 200 mg/ml streptomycin) and 2mM L-glutamine. SW480 and SW620 cells were maintained in DMEM F-12 supplemented with 5% (v/v) FBS, antibiotics and 2mM glutamine. All cells were cultured in a humidified 5% (v/v) CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. For starvation cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, GIBCO/Invitrogen) and placed in HBSS buffer (GIBCO/Invitrogen).

### Western Blotting

Protein samples (30  $\mu$ g) were separated by 10% SDS-PAGE followed by electrophoretic transfer onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membranes were blocked with 5% (w/v) non-fat dry milk and incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibody. Detection was performed using the SuperSignal Kit (Pierce) with a horseradish peroxidase-conjugated second antibody. Actin or  $\beta$ -tubulin were used as control for equal loading.

### Immunofluorescence and Confocal Microscopy

Cells were seeded into 8-chamber culture slides (LabTek®) at  $5 \times 10^4$  cells/ml per chamber overnight. Then, samples were fixed with 1% (w/v) of paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature (RT). Fixed cells were washed with PBS and cell permeabilization were performed with 1% (v/v) Triton X-100 in PBS for 5 min. Unspecific interaction sites were blocked with 3% (w/v) BSA/PBS. After washing, the slides were incubated with anti-O-GlcNAc, anti-CD133 or anti-CD44 primary antibodies (Abcam) diluted in 1% (m/v) BSA/PBS overnight at 4°C in darkness. Cells were washed with PBS, followed by incubation with secondary Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit or Alexa 488-conjugated goat anti-mouse antibodies (Invitrogen) for 2 h at RT. Chambers were incubated with DAPI (SIGMA Aldrich) in PBS for 5 min at RT. After washing three times with PBS, the slides were mounted with Vectorshield® (Vector

Labs, CA). Cells were examined under a Nikon A1R+ STORM confocal microscopy. Pictures were analyzed with ImageJ.

### Flow Cytometry

For membrane staining of CD44 and CD133,  $1 \times 10^4$  cells were detached with EDTA-PBS 10 mM solution, scraped gently and collected by centrifugation at 500g. Pellet were washed twice with PBS and samples were incubated with anti-CD44-APC coupled (BD Bioscience), anti-CD133-PE-coupled (Myltenyi), or with a mix of CD44/CD133 during 20 min at 4°C in darkness. Then, PBS were added and cells were newly centrifuged. Finally, samples were analyzed with an Attune<sup>®</sup> cytometer.

For intracellular staining of OGT and O-GlcNAc, cells were detached in the same way but immediately they were fixed with 1% (m/v) of paraformaldehyde in PBS for 10 min at 4°C. Fixed cells were permeabilized with absolute methanol for 20 min on ice and unspecific interaction sites were blocked with 3% (m/v) BSA in PBS. Anti O-GlcNAc (RL2) or anti-OGT antibodies were added during 30 min at 4°C in darkness. Cells were washed one time and incubated with FITC-coupled anti-mouse or FITC-coupled anti-rabbit secondary antibodies. Cell were washed one time with PBS. Finally, samples were analyzed with a FACScalibur cytometer. All data were analyzed by FlowJo X software.

### Cell Sorting

As in flow cytometry, cells were detached in the same conditions. Samples were incubated with APC-conjugated anti CD44 (BD Bioscience), PE-conjugated anti-CD133 or a mix of anti-CD44/CD133 during 20 min at 4°C in darkness. Cells were washed. Samples were filtrated and collected in special cell cytometry sterile tubes. Cell sorting was performed to separate CD44+, CD133+ or CD44+/CD133+ (double positive) cells in a MoFlow Sorter. Later cells were seeded in different culture media types (DMEMF-12 with 5% (v/v) FBS, colony formation medium with ITS, or 3D culture media).

### Pharmacological Inhibitions

$8 \times 10^5$  cells were seeded in 6 -well culture plaques and incubated overnight. Then, for inhibition of OGT, cells were incubated 24 h in the absence (vehicle DMSO) or presence of Ac5SGlcNAc (50  $\mu$ M final dilution), and for inhibition of OGA, were incubated 24 h in the absence (vehicle DMSO) or presence of Thiamet-G (1  $\mu$ M final dilution). Cells were incubated at 37°C, and pictures of cell cultures for each treatment were taken at the end of incubation periods. The cells were then collected to perform flow cytometry and to make lysates for Western blotting.

### Apoptosis

Apoptosis was measured using the Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Sigma-Aldrich) as recommended by the manufacturer's instructions. Briefly, after 24 h of incubation with Ac5sGlcNAc or ThiametG, cells were gently scraped (we did no use trypsin to detach cells to avoid the unspecific exposure of Annexin V), centrifuged and washed twice in PBS. Annexin V-FITC in the staining buffer and propidium iodide were added to cell suspension and incubated for 10 min at room temperature. Cell were washed and analyzed with Attune Flow Cytometer.

### Proliferation Assay

Proliferation was measured by labeling of cells with the fluorescent dye Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to track generations of cells, since the associated fluorescence signal decreases by half with each cell division cycle.  $5 \times 10^4$  cells were incubated with CFSE (1  $\mu$ M) in PBS during 20 min at 37°C. Then, cells were centrifuged and seeded on 12-well tissue culture plates. Cells were incubated in the absence or presence of Ac5sGlcNAc or ThiametG 24h, then collected, centrifuged and analyzed by flow cytometry.

### Colony Formation Assay

After cell sorting, 500 cells were seeded in 6- well culture plaques with DMEM F-12 medium supplemented with insulin, transferrin and Selenite grow supplement (1X). After 2 weeks, pictures for each condition were taken and colonies on the plaque were counted.

### 3D Culture

After cell sorting, 500 cells were seeded in 6- well ultra-low attachment cell culture plaques with DMEM F-12 medium containing B27 (2% v/v) and EGF (20ng/ml) per duplicate. After 3 weeks, pictures for each condition were taken, and spheroids were collected to be lysed for Western blot analysis.

### Statistical Analysis

The data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical data analysis was performed using Student's *t*-test or a one-way-ANOVA with Tukey's multiple comparison test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### Expression Profile of Stem Cell Markers in Colon Cancer Cells Changes During Cancer Progression

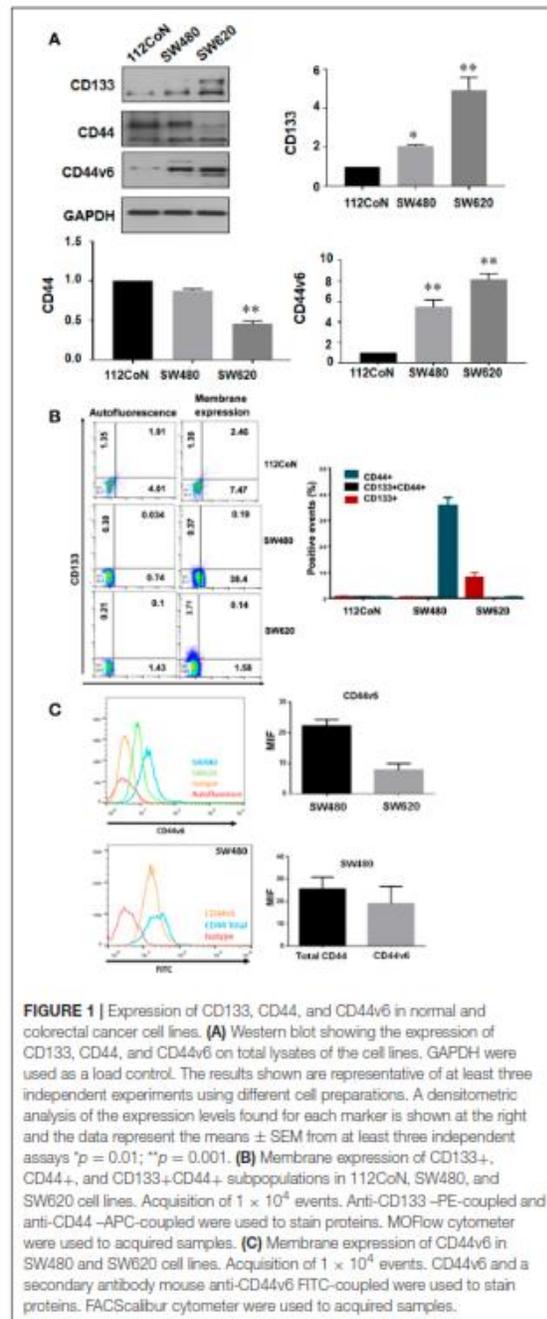
Several colorectal CSC markers have been reported to date, including CD133, CD44, CD24, CD166, and Lgr-5 (1, 2). CD44 isoform containing variant exon v6 (CD44v6) has also been reported to play an important role in the progression, metastasis, and prognosis of colorectal cancer (CRC) (3, 4). Because CD133 and CD44 have been widely validated as CSC markers in a variety of solid tumors including colon cancer, we examined their expression in human colon cancer cells. We selected as a model the primary SW480 colon carcinoma cell line and its derivative metastatic SW620 cell line which express a truncated version of APC, have constitutively active Wnt signaling and are prototype of KRAS-driven colon cancer cells in comparison with the non-malignant colon cell line 112CoN (Figure 1). Western blot analysis performed in total cells extracts shown in Figure 1A, indicated that CD133 marker, which appears as a doublet, is enriched in metastatic SW620 cells, while CD44, also seen as a doublet, was found mainly expressed both in non-malignant 112CoN cells and in primary cancer SW480 cells. The CD44 isoform, CD44v6, was found expressed only in both cancer SW480 and SW620 cells. Interestingly, when we analyzed the membrane expression of these stem cell markers

by FACS (Figures 1B,C), we observed that neither CD133 nor CD44 are expressed in non-malignant colon cells at the cell membrane. In addition, we observed that SW480 cells only express CD44/CD44v6 but do not express CD133. Remarkably, SW620 cells, which are derived from a metastasis of the same tumor from which the SW480 cells were derived, only express CD133 and CD44v6, but do not longer express CD44. These results indicate therefore that there must have been a change in the expression profile of stem cell markers during malignant progression. Moreover, although non-malignant cells contain CD44, they do not express it at the cell membrane and in contrast, a great proportion of the total CD44 expressed at the cell membrane in SW480 cells corresponds to CD44v6, as shown in Figure 1C.

### Colon Cancer Cell Lines Have Increased O-GlcNAcylation Levels Compared With Non-malignant Colon Cells and Perturbation of These Levels Increased the Expression of Stem Cell Markers

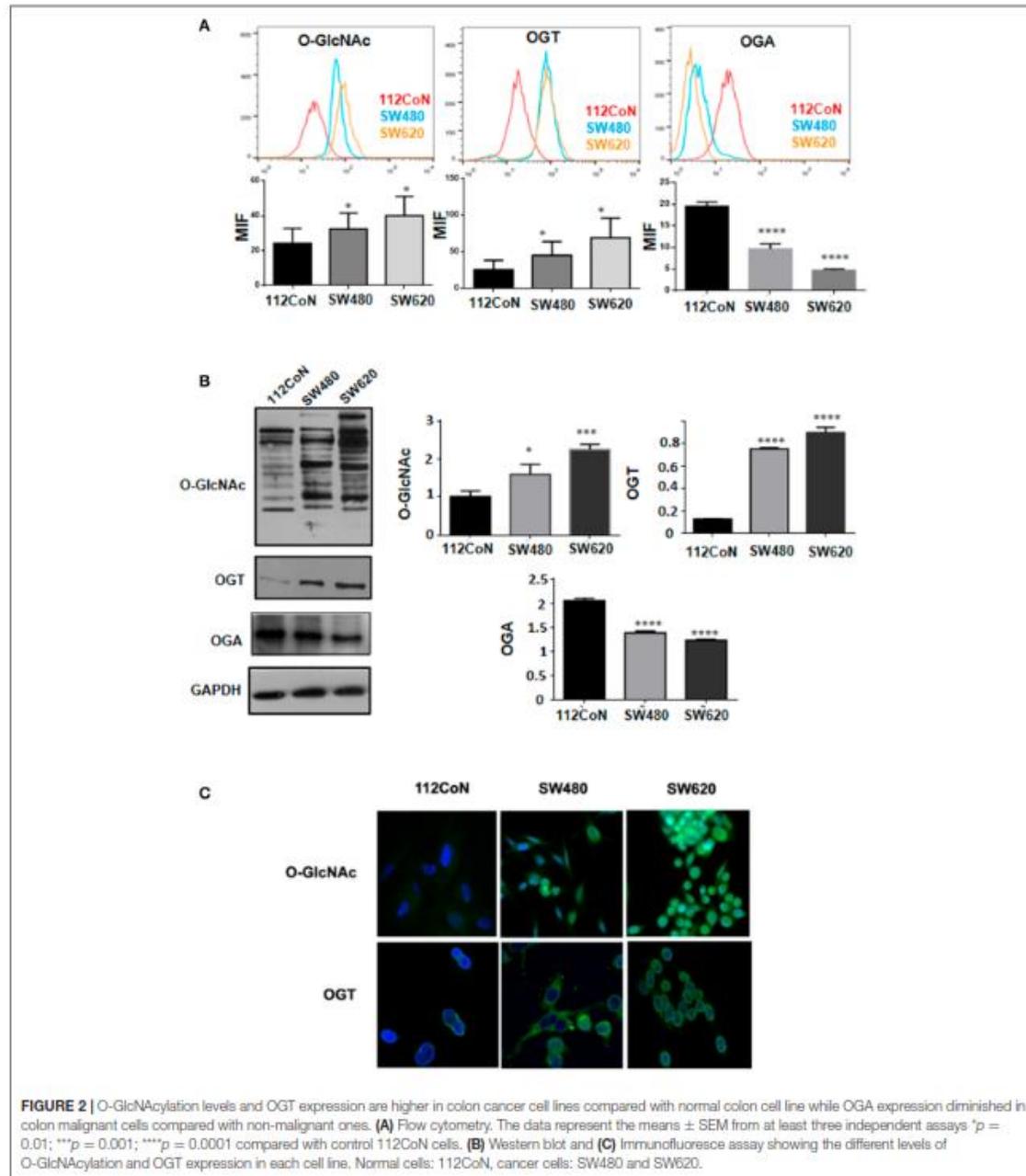
Increased O-GlcNAcylation levels have been reported in diverse types of cancers including colon cancer (10, 11). To determine the levels of O-GlcNAcylation, OGT expression, and OGA expression in colon cancer cells compared to non-malignant colon cells, we performed FACS analysis, Western blot analysis, and immunofluorescence assays. The results shown in Figure 2A (FACS analysis), Figure 2B (Western blot analysis), and Figure 2C (immunofluorescence assays) clearly indicated that, as previously reported, the O-GlcNAcylation levels are higher in colon cancer cells compared to non-malignant cells. Consistent with this, Figures 2A,B show how the expression of OGT, which adds O-GlcNAc, appears increased while that of OGA, which removes it, appears diminished in colon malignant cells, compared with the expression found in colon non-malignant cells.

We next investigated the effects produced by perturbation of O-GlcNAc levels on the expression of stem cell markers CD44 and CD133 by pharmacological inhibition of OGT or OGA in colon cancer cells. We first examined by Western blot the effectiveness of the OGT inhibitor Ac5SGlcNAc (50  $\mu$ M) to decrease O-GlcNAc levels on cells and of the OGA inhibitor Thiamet-G (1  $\mu$ M) to increase O-GlcNAc levels (Figure 3). As it can be observed in Figure 3A, as expected, when OGA was inhibited, a global elevation of protein O-GlcNAcylation was observed in both cancer cell lines, whereas inhibition of OGT induced a strong decrease in O-GlcNAc levels compared with controls in both cell lines. Pictures taken 24 h after incubation of cells with the OGT or OGA inhibitors are shown in Figure 3B. It is interesting to observe in this figure that in both cell lines the inhibition of OGT, but not of OGA, produced a decrease in the total number of cells seen in the pictures. Because the decreased amount of cells could be caused by a decrease in the proliferation rate or by an increase in the apoptotic cell death, we decided to analyze the impact of the inhibition of OGT or OGA on both processes in malignant cells. The results presented in Figure 3C indicate that the OGT inhibition negatively affected



**FIGURE 1** | Expression of CD133, CD44, and CD44v6 in normal and colorectal cancer cell lines. **(A)** Western blot showing the expression of CD133, CD44, and CD44v6 on total lysates of the cell lines. GAPDH were used as a load control. The results shown are representative of at least three independent experiments using different cell preparations. A densitometric analysis of the expression levels found for each marker is shown at the right and the data represent the means  $\pm$  SEM from at least three independent assays \* $p$  = 0.01; \*\* $p$  = 0.001. **(B)** Membrane expression of CD133+, CD44+, and CD133+CD44+ subpopulations in 112CoN, SW480, and SW620 cell lines. Acquisition of  $1 \times 10^4$  events. Anti-CD133 -PE-coupled and anti-CD44 -APC-coupled were used to stain proteins. MOFlow cytometer were used to acquired samples. **(C)** Membrane expression of CD44v6 in SW480 and SW620 cell lines. Acquisition of  $1 \times 10^4$  events. CD44v6 and a secondary antibody mouse anti-CD44v6 FITC-coupled were used to stain proteins. FACSscan cytometer were used to acquired samples.

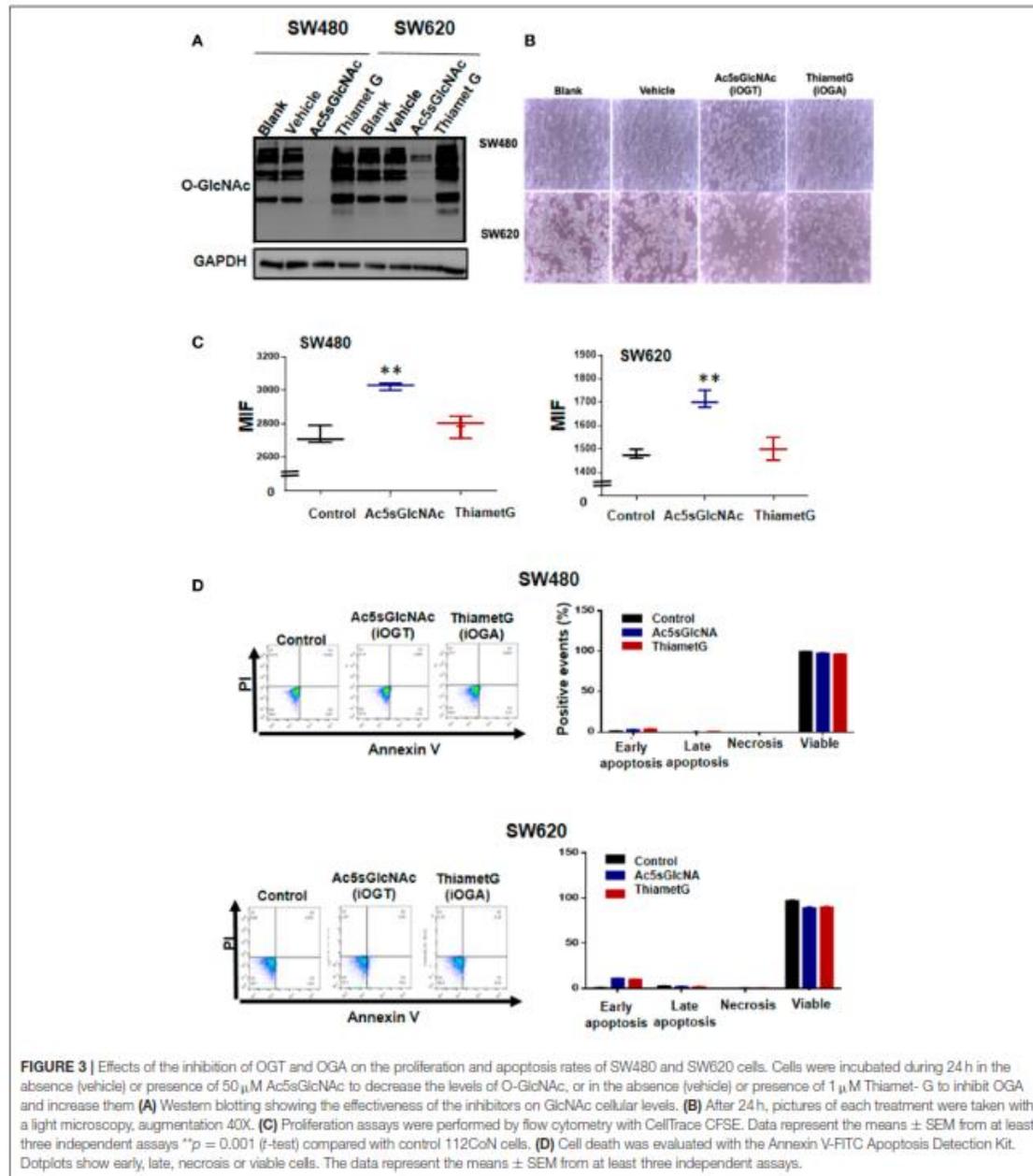
the proliferation of both SW480 and SW620 malignant cells, as reported before in other cancer cell types (10) and in colon cancer cells (12). The inhibition is visualized in the figure as a



retention of the fluorescent compound CFSE in cells treated with Ac5sGlcNAc because they did not proliferate, while in control or in Thiamet-G - treated cells the fluorescence signal decreased with each cell division cycle. In addition, neither the treatment of cells with the OGT inhibitor nor with the OGA inhibitor

significantly affected the apoptosis rate of both SW480 or SW620 cells, as shown in Figure 3D.

We next investigated the effects of the modification of O-GlcNAc levels on the expression of cancer stem cell markers by FACS analysis. The results presented in Figure 4A clearly



indicated that the inhibition of OGA did not affect the expression profile of CD44 and CD133 stem cell markers in either SW480 cells or SW620 cells compared with control untreated cells. However, and in clear contrast, the inhibition of OGT in the

metastatic SW620 cell line, induced the expression of CD44 and an increase in CD133 expression. In addition, and remarkably, OGT inhibition induced the appearance of a double positive CD44+/CD133+ cell subpopulation in both primary SW480

and metastatic SW620 cancer cell lines. Thus, these results suggested that the inhibition of OGT increases the stemness in colon cancer cells. Consistent with this, when we incubated both control or treated cells with the OGT or the OGA inhibitors in sphere formation and in clonogenic activity assays, only the Ac5sGlcNAc-treated SW480 or SW620 cells formed well-defined and condensed spheres as observed in **Figure 4B**, and the clonogenic activity only increased in the OGT-inhibited cells, as it can be seen in **Figure 4C**. Moreover, the analysis of the expression of CD44 and CD133 stem cell markers by Western blotting in both SW480 and SW620 control or treated cells showed a significant increase in the CD44 and CD133 expression only in the OGT-inhibited cells compared with the OGA-inhibited and with control cells (**Figure 4D**).

### Double Positive CD133/CD44 Stem Subpopulations Induced as Result of OGT Inhibition Display More Aggressive Phenotype Compared With Single Positive Subpopulations

The appearance of double positive CD133/CD44 cancer cells has been characteristically found in several highly metastatic tumors of colon, liver, pancreas, and gallbladder (13–19). Therefore, we decided to investigate if this event correlated with a change to a more aggressive malignant phenotype. To this end, we analyzed the typical cancer stem cell traits such as clonogenic and spheroid formation abilities in the double positive CD44/CD133 cell subpopulations compared with the single positive subpopulations obtained as result of OGT inhibition. As depicted in **Figure 5A**, the stem cell subpopulations found in each colon cell line after incubation with the OGT inhibitor were isolated by FACS-cell sorting and cultured for analysis of clonogenicity and of their ability to form spheroids in 3D cultures. The results presented in **Figure 5B** show that as expected, SW620 cells, which are metastatic, clearly formed more colonies than primary SW480 cells. But interestingly, when single positive stem marker subpopulation was compared with double positive CD44/CD133 subpopulation in each cell line, the double positive displayed an increased clonogenicity ability, indicative of a more aggressive malignant phenotype (**Figure 5B**). We also performed 3D culture in selective media to induce colonosphere formation, and as shown in **Figure 5C**, we observed that both subpopulation types in either SW480 or SW620 cells had the ability to form spheres in the selective medium. However, the double positive stem cell subpopulation in either SW480 or SW620 cells formed much bigger and condensed spheroids than single positive marker subpopulations, particularly in the metastatic cell line SW620. Finally, the evaluation of the levels of O-GlcNAcylation in the isolated stem cell subpopulations derived from SW480 or SW620 cells treated with OGT inhibitor (**Figure 5D**) showed that whereas SW480 double positive stem cell subpopulation displayed higher levels of O-GlcNAc compared with their single marker counterparts, there was no significant change in the O-GlcNAc levels found in SW620 double positive stem cells compared with single positive stem cells. It must be taken into

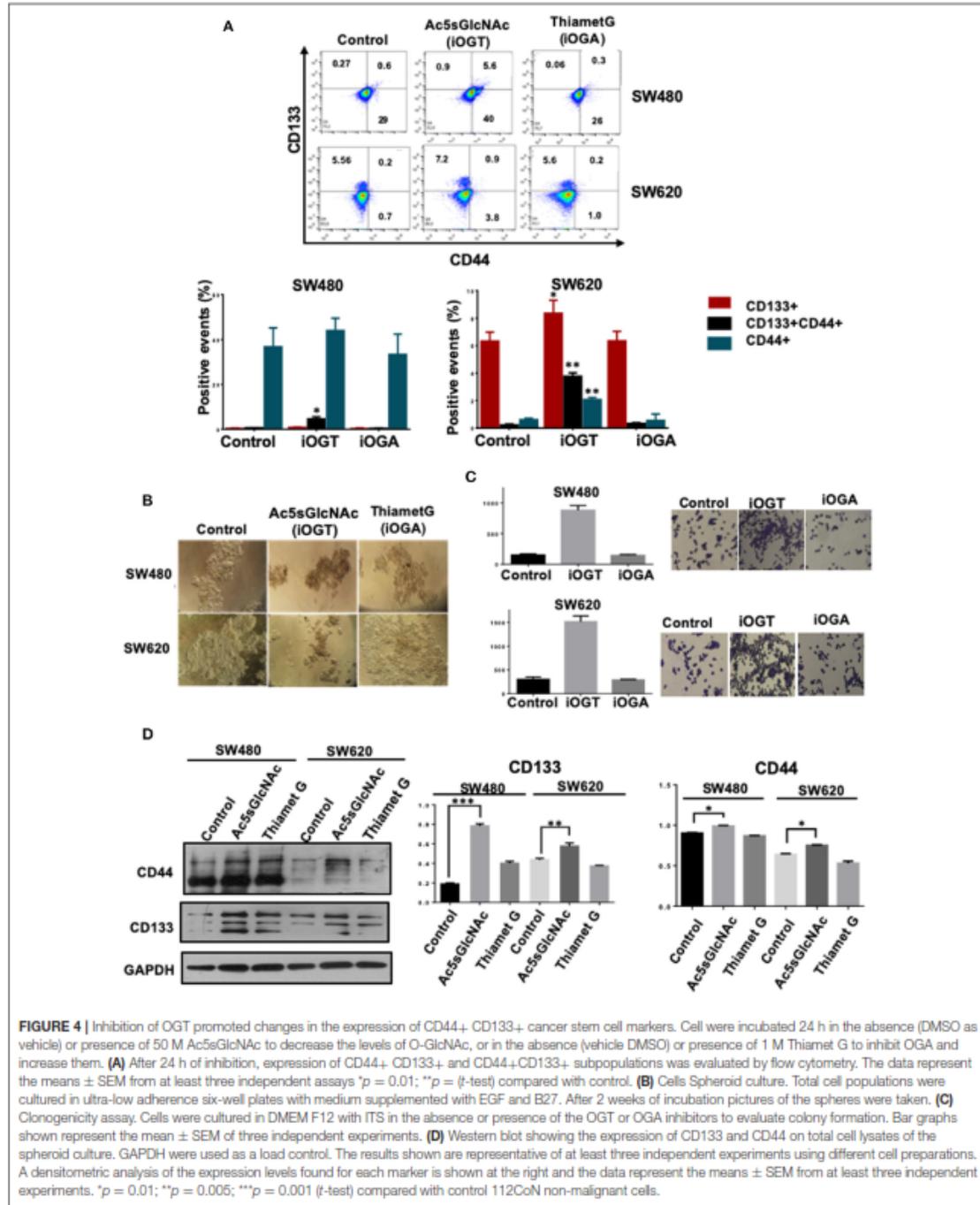
account that after exposure of stressful conditions, and once cells adapt to the growth conditions, the O-GlcNAc levels are recuperated. However, it is interesting to note that.

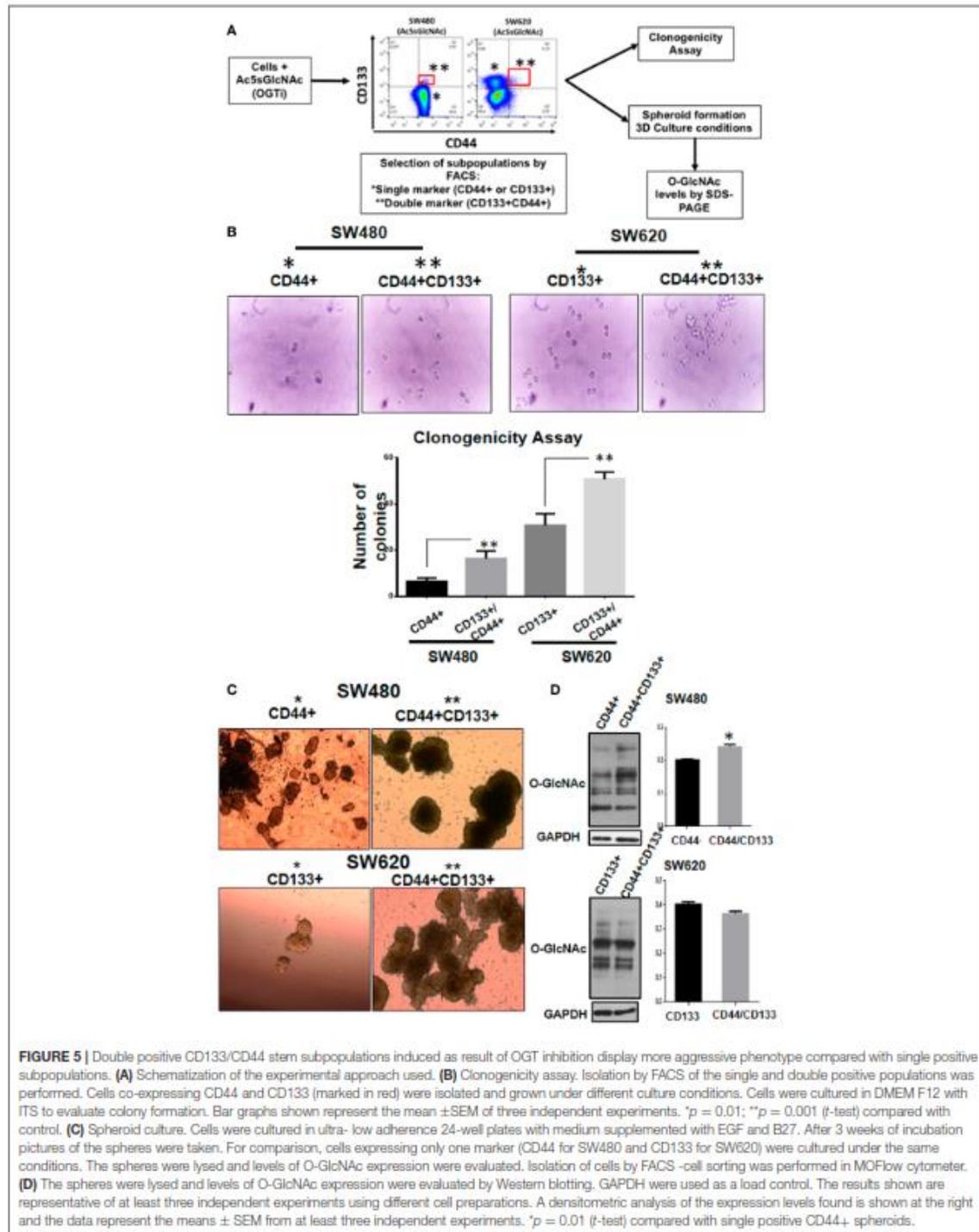
### Nutritional Stress Mimics OGT Inhibition Effects in Cancer Stem Cell Expression

We found that the inhibition of OGT in both primary and metastatic colon cancer cell lines induced not only an increase in stem cell markers expression but also, induced an aggressive phenotype associated with the appearance of double positive stem cell markers subpopulations. Accumulating experimental evidence has shown that microenvironmental stress signals in tumors drive phenotypic plasticity and invasion and determine therapeutic outcome. Nutritional stress, particularly glucose deprivation, would diminish UDP-GlcNAc availability and as a consequence, O-GlcNAc intracellular levels. Thus, we hypothesized that exposure of cells to nutritional stress would mimic the effects of OGT inhibition. To this end, growth medium from SW480 or SW620 cells was replaced with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) for 4, 8, 16, or 24 h (**Figure 6**). Cells were then collected at these time points and assessed for O-GlcNAcylation levels, OGT expression levels, and stem cell markers expression by Western blot. Results presented in **Figure 6A** clearly showed that in agreement with our hypothesis, exposure of SW480 or SW620 cells to acute nutritional stress mimicked the inhibition of OGT, since the total O-GlcNAcylation levels and the OGT expression levels were both reduced in a time-dependent manner, being greatly diminished after 16 and 24 h of incubation of cells in HBSS. In addition, results presented in **Figure 6B** (CD133 expression), **6C** (CD44 expression), and **6D** (CD44v6 expression), show that indeed, nutritional stress induced a general increase in stem cell marker expression both in SW480 and SW620 cells compared with controls (time 0), that was significant after 8 h of starvation. It is noteworthy that SW480 cells, which under normal culture conditions do not express CD133 stem cell marker, under stressful conditions induce its expression, in addition to increase CD44/CD44v6 expression in a similar manner as when OGT is inhibited. Taken together, these results confirmed that starvation increased the expression of stem cell markers, reinforcing the notion that the activity of OGT is closely integrated with the nutritional status of the cell, and that increased O-GlcNAc levels appeared to be part of an endogenous nutrient stress response that is linked to cell survival.

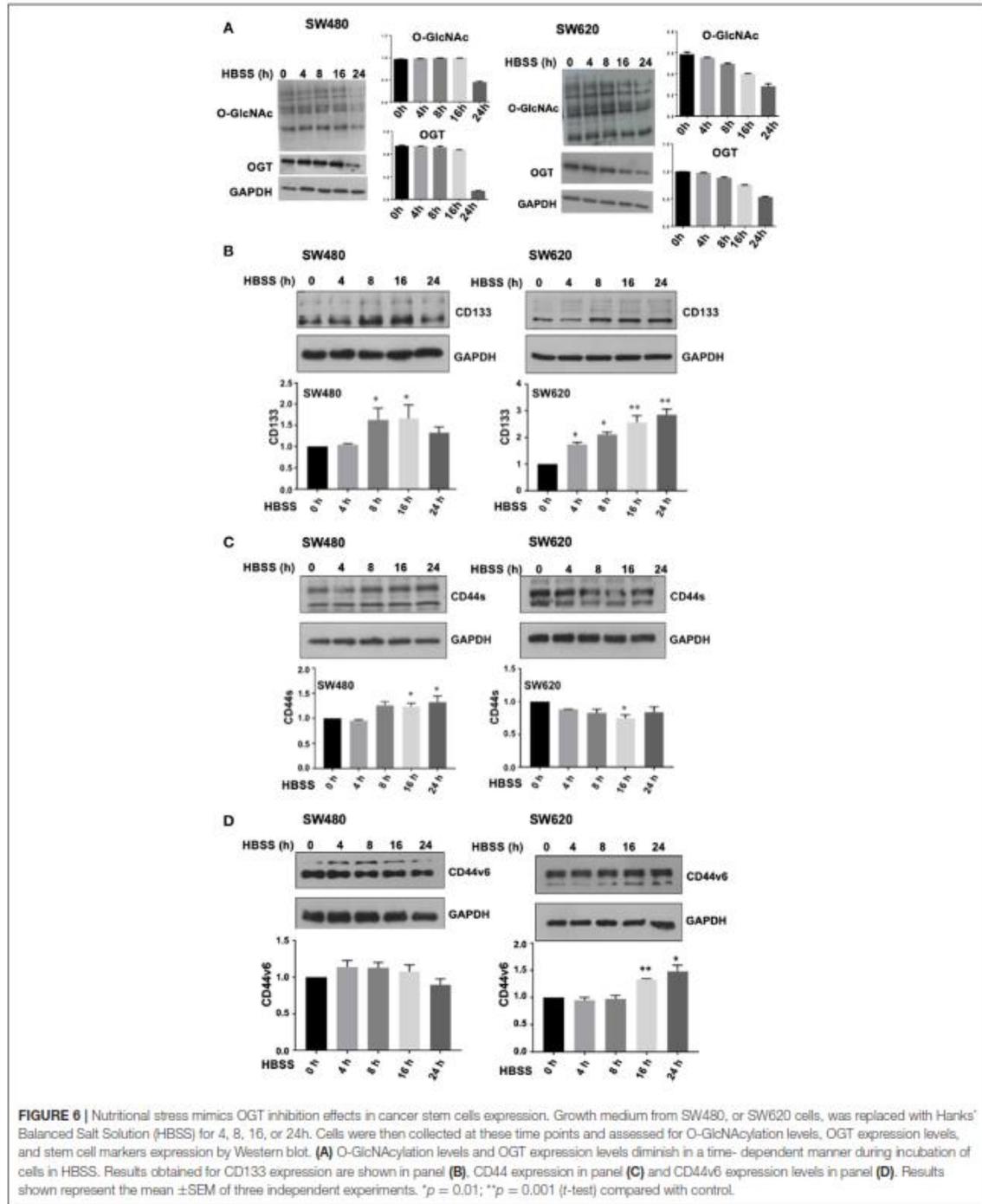
### DISCUSSION

The presence of CSC subpopulations has been identified in nearly all human malignancies. CD133, also called Prominin-1, is a pentaspan transmembrane protein which has been used as a biomarker to identify and isolate stem cells from cancer tissues, including those emerging from colorectal mucosa. The presence of CD133 positive cells have been associated with an aggressive phenotype in several tumor types including CRC. Consistent with this, it has been reported that the CD133+ subpopulation is higher in liver metastasis than in primary colorectal tumors (13). In addition, it has also been demonstrated that CD133+





**FIGURE 5 |** Double positive CD133/CD44 stem subpopulations induced as result of OGT inhibition display more aggressive phenotype compared with single positive subpopulations. **(A)** Schematization of the experimental approach used. **(B)** Clonogenicity assay. Isolation by FACS of the single and double positive populations was performed. Cells co-expressing CD44 and CD133 (marked in red) were isolated and grown under different culture conditions. Cells were cultured in DMEM F12 with ITS to evaluate colony formation. Bar graphs shown represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p = 0.01$ ; \*\* $p = 0.001$  (*t*-test) compared with control. **(C)** Spheroid culture. Cells were cultured in ultra-low adherence 24-well plates with medium supplemented with EGF and B27. After 3 weeks of incubation pictures of the spheres were taken. For comparison, cells expressing only one marker (CD44 for SW480 and CD133 for SW620) were cultured under the same conditions. The spheres were lysed and levels of O-GlcNAc expression were evaluated. Isolation of cells by FACS -cell sorting was performed in MOFlow cytometer. **(D)** The spheres were lysed and levels of O-GlcNAc expression were evaluated by Western blotting. GAPDH were used as a load control. The results shown are representative of at least three independent experiments using different cell preparations. A densitometric analysis of the expression levels found is shown at the right and the data represent the means  $\pm$  SEM from at least three independent experiments. \* $p = 0.01$  (*t*-test) compared with single positive CD44+ spheroids.



cells show a high degree of chemoresistance (20, 21). It is interesting to note that in agreement with this, in our study we found that under normal culture conditions, primary SW480 colon cancer cells express the CD44 stem marker and do not express CD133, whereas their derivative metastatic SW620 cell line mainly expresses CD133.

CD44 is a transmembrane glycoprotein which has also been identified as being expressed by many tumor CSCs. It participates in a variety of biological functions such as cell adhesion, tumor cell migration, growth, differentiation, survival, or even in chemoresistance (3, 22, 23). However, CD44s is the smallest and the standard isoform codified by 10 exons, without products of variant additional exons, and the CD44 variants are isoforms expressing additional segments (v2–v10) in the extracellular domain that are generated by alternative splicing (4). Both the standard and the variants can all be recognized by an antibody directed against the standard region but importantly, the expression of CD44 variants has only been found in cancer cells and has been reported as produced during tumor progression (3, 4). Thus, different cells of a tumor can express various, and possibly different sets of CD44 isoforms. In CRC the v6-containing isoform of CD44 is the most frequently found to be associated with metastatic phenotype in the literature (24). It was also found that CD44v6 is involved in acquired drug resistance in CRC (4). According with this notion, while the glandular epithelium of the large bowel expresses the standard form of CD44 but not variant ones, in contrast, highly dysplastic colorectal adenomas, primary and metastatic CRC, express CD44v isoforms (3, 4). In agreement with this, here we found that non-malignant fetal colon 112CoN cells express CD44 but do not express CD44v6, which we found only expressed in colon malignant cells.

In this study we found that in colon cancer cells the inhibition of OGT or the exposure of cells to an acute nutritional stress mimicking the lack of OGT, induce the appearance of an aggressive CD133/CD44 double positive CSC subpopulation. In agreement with our results, these CD133+CD44+ cancer cells have been characterized in several highly metastatic tumors such as CRCs (13–16), HCCs (17), pancreatic cancers (18), and gallbladder carcinoma (19). It has also been reported that in CRC with early liver metastases, co-expression of CD133 and CD44 is significantly higher when compared to those without early liver metastases (15).

To date, the functions played by O-GlcNAcylation in stem cells and pluripotency has been poorly investigated and remains unclear. In this respect, Jang et al. (5) have shown that blocking O-GlcNAcylation inhibited ESC self-renewal and the efficiency of inducible pluripotent stem cells (iPSC) generation, whereas increasing O-GlcNAcylation inhibited normal ESC differentiation. Other authors have also shown that O-GlcNAc is required for ESC survival, and that OGT knockout mouse shows embryonic lethality (5, 25). In addition, experimental evidence has revealed that O-GlcNAc controls pluripotency by directly regulating transcriptional activities of core components of the pluripotency network. Numerous stem cell factors have been shown O-GlcNAcylated such as Oct4 (26) or Sox2 (5). Whereas, the role of Sox2 O-GlcNAcylation is still unclear, Oct4 interacts

with OGT and is modified in order to regulate pluripotency gene networks (26).

Here we investigated the effects produced by the modification of O-GlcNAc levels on the expression of stem cell markers CD44 and CD133 by pharmacological inhibition of OGT or OGA, the enzymes which catalyze the addition and removal of O-GlcNAc, respectively. A salient feature obtained here is that we not only confirmed that O-GlcNAc serves as a nutrient sensor and the activity of OGT is closely integrated with the nutritional status of the cell, as previously reported in other cell systems, but also that increased O-GlcNAc levels appeared to be part of an endogenous stress response that is linked to cell survival. In this respect, accumulating experimental evidence has shown that O-GlcNAcylation acts as a nutrient sensor that associates the glucose metabolic status with cellular regulation of signal transduction, transcription, protein function and differentiation (7, 27). As mentioned before, in cancer cells, metabolism is dramatically altered compared with normal cells. They reprogram their metabolism to undergo a high rate of glycolysis and lactic acid fermentation, even under normoxic conditions [Warburg effect (28)]. One consequence of these changes is cellular addiction to glutamine, that in turn, increases the flux through the hexosamine biosynthetic pathway (HBP). Because HBP requires glucose, glutamine, fatty acids, and UTP, is thereby positioned to integrate information on the availability of nutrients (7, 10). Importantly, HBP produces the high-energy-donor UDP-GlcNAc, which is the sugar donor involved in the synthesis of other nucleotide sugars, complex glycosylation and also utilized by OGT to modify target proteins (10, 27).

Increased OGT expression has been detected in numerous cancers, including bladder cancer (29) and lung and colon cancers (30). In addition, HBP enzymes have also been reported to be over-expressed in human prostate cancer patients (10, 31). Here we confirmed that OGT is overexpressed in colon cancer cells compared with non-malignant colon cells. When we decreased O-GlcNAc levels as a result of OGT inhibition, we observed, as previously reported, a decrease in cell survival, but unexpectedly, we also observed that the decrease in O-GlcNAc levels induced the appearance of an aggressive CD44+/CD133+ small subpopulation which in turn expressed high O-GlcNAc levels. In this respect, we found that whereas SW620 double positive stem cells displayed lower levels of O-GlcNAc levels than single positive ones as expected, unexpectedly, SW480 double positive stem cell subpopulation displayed higher levels of O-GlcNAc compared with their single marker counterparts. But it must be taken into account that the O-GlcNAc levels examined in the spheroids derived from the double positive stem cells were obtained from 3-week old 3D spheroids cultures. Thus, a decrease in O-GlcNAc levels would be expected to happen only as result of starvation or if glucose were deprived in tumor cells, but once they adapt to the growth conditions, O-GlcNAc levels recuperate as a result of their metabolism. However, it is interesting to note that these levels are lower in the metastatic SW620 cells, compared with the primary SW480 cells from which they derived. Since a decrease in O-GlcNAc levels would be expected to happen if glucose were deprived, we reasoned that the exposure of cells to an acute nutritional

stress would mimic the effects produced by OGT inhibition. Indeed, our results confirmed that starvation increased the expression of stem cell markers, reinforcing the notion that the HBP pathway and OGT activity are intimately integrated with the nutritional status of the cell and contribute to regulate stemness maintenance.

In this work we also found that the increased O-GlcNAc levels observed in colon cancer cells appeared to be part of an endogenous nutrient stress response that is linked to cell survival. In this respect, our data are consistent with the notion that O-GlcNAc modification of proteins is a metabolically modulated signaling pathway that regulates cell function and plays a particularly critical role in mediating the response of cells to stress (32). Evidence of this was first reported in 2004, by Zachara et al. when O-GlcNAc levels were shown to increase in response to a diverse array of stress stimuli, and inhibition of this response resulted in reduced cell survival (33). Other authors have also shown that O-GlcNAc levels are increased in response to stress, that augmentation of O-GlcNAc levels conferred increased tolerance to stress (32), and that the acute augmentation of this response is cytoprotective, even in the cardiovascular system (32, 34). Therefore, our data support that O-GlcNAcylation modification of proteins not only functions as a nutrient status sensor which plays a critical role in stemness maintenance, but also that it is an important mediator of the response of cells to stressful conditions.

## ETHICS STATEMENT

This work has been conducted following the ethical standards according to the Declaration of Helsinki and according to

national and international guidelines and has been approved by the Faculty of Medicine Ethical Committee from Universidad Nacional Autónoma de México.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MR-F, TL, and GF-G conceived and designed the experiments. GF-G, MC-P, and A-SV-E performed the experiments. MR-F, TL, and GF-G analyzed the data. MR-F and TL contributed reagents, materials, and analysis tools. MR-F wrote the manuscript.

## FUNDING

This research was supported by grants from Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM IN215514 and IN225717) and from CONACYT (FOSSIS 2017-289600).

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the LABNALCIT-UNAM (CONACYT) technical support in the acquisition and analysis of flow cytometry samples, especially to MS Erick Christian Ivan Espindola Arriaga. We want also thank to Dr. Miguel Tapia Rodríguez from the Microscopy unit of IIB-UNAM and Dr. Stephan Hardivillé from the University of Lille for the kindly donation of Ac5SGlcNAc and Dr. Chan Lagadec from th Cell Plasticity and Cancer team (INSERM U808) for helping in FACS access. GF-G is a Ph.D. student in the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and was granted with a Fellowship by DGAPA, UNAM, Mexico and by CONACYT.

## REFERENCES

- Taniguchi H, Moriya C, Igarashi H, Saito A, Yamamoto H, Adachi Y, et al. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancer. *Cancer Sci.* (2016) 107:1556–62. doi: 10.1111/cas.13069
- Kim ST, Sohn I, Do I-G, Jang J, Kim SH, Jung SH, et al. Transcriptome analysis of CD133-positive stem cells and prognostic value of survivin in colorectal cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* (2014) 11:259–66. doi: 10.1016/S0959-8049(14)70327-2
- Bánky B, Rásó-Barnett L, Barbai T, Timár J, Becságh P, Rásó E. Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression. *Mol Cancer.* (2012) 11:83. doi: 10.1186/1476-4598-11-83
- Lv L, Liu H-G, Dong SY, Yang F, Wang Q-X, Guo G-L, et al. Upregulation of CD44v6 contributes to acquired chemoresistance via the modulation of autophagy in colon cancer SW480 cells. *Tumor Biol.* (2015) 37:8811–24. doi: 10.1007/s13277-015-4755-6
- Jang H, Kim TW, Yoon S, Choi SY, Kang TW, Kim SY, et al. O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell.* (2012) 11:62–74. doi: 10.1016/j.stem.2012.03.001
- Ogawa M, Sawaguchi S, Kamemura K, Okajima T. Intracellular and extracellular O-linked N-acetylglucosamine in the nervous system. *Exp Neurol.* (2015) 274:166–74. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.08.009
- Sharma NS, Saluja AK, Banerjee S. Nutrient-sensing and self-renewal: O-GlcNAc in a new role. *J Bioenerg Biomembr.* (2017) 50:205–11. doi: 10.1007/s10863-017-9735-7
- Jeon JH, Suh HN, Kim MO, Ryu JM, Han HJ. Glucosamine- induced OGT activation mediates glucose production through cleaved Notch1 and FoxO1, which coordinately contributed to the regulation of maintenance of self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* (2014) 23:2067–79. doi: 10.1089/scd.2013.0583
- Marsboom G, Zhang GE, Pohl-Avila N, Zhang Y, Yuan Y, Kang H, et al. Glutamine metabolism regulates the pluripotency transcription factor OCT4. *Cell Rep.* (2016) 16:323–32. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.089
- Itkonen HM, Gorad SS, Duveau DY, Martin SES, Barkovskaya A, Bathen TE, et al. Inhibition of o-GlcNAc transferase activity reprograms prostate cancer cell metabolism. *Oncotarget.* (2016) 7:12464–76. doi: 10.18632/oncotarget.7039
- Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issat T. O-GlcNAcylation: a new cancer hallmark? *Front Endocrinol.* (2013) 4:99. doi: 10.3389/fendo.2013.00099
- Steenackers A, Olivier-Van Stichelen S, Baldini SE, Dehennaut V, Toillon RA, Le Bourhis W, et al. Silencing the nucleocytoplasmic O-GlcNAc transferase reduces proliferation, adhesion, and migration of cancer and fetal human colon cell lines. *Front Endocrinol.* (2016) 7:46. doi: 10.3389/fendo.2016.00046
- Li Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hematol Oncol.* (2013) 2:17. doi: 10.1186/2162-3619-2-17
- Chen KL, Pan F, Jiang H, Chen JF, Pei L, Xie FW, et al. Highly enriched CD133(+)-CD44(+) stem-like cells with CD133(+)-CD44(high) metastatic subset in HCT116 colon cancer cells. *Clin Exp Metast.* (2011) 28:751–63. doi: 10.1007/s10585-011-9407-7
- Huang X, Sheng Y, Guan M. Co-expression of stem cell genes CD133 and CD44 in colorectal cancers with early liver metastasis. *Surg Oncol.* (2012) 21:103–7. doi: 10.1016/j.suronc.2011.06.001

16. Bellizzi A, Sebastian S, Ceglia P, Centonze M, Divella R, Manziello EE, et al. Co-expression of CD133 (+)/CD44(+) in human colon cancer and liver metastasis. *J Cell Physiol.* (2013) 228:408–15. doi: 10.1002/jcp.24145
17. Hou Y, Zou Q, Ge R, Shen F, Wang Y. The critical role of CD133(+)/CD44 (+/high) tumor cells in hematogenous metastasis of liver cancers. *Cell Res.* (2012) 22:259–72. doi: 10.1038/cr.2011.139
18. Wang D, Zhu H, Zhu Y, Liu Y, Shen H, Yin R, et al. CD133(+)/CD44 (+)/Oct4(+)/Nestin(+) stem-like cells isolated from Panc-1 cell line may contribute to multi-resistance and metastasis of pancreatic cancer. *Acta Histochem.* (2013) 115:349–56. doi: 10.1016/j.acthis.2012.09.007
19. Shi C, Tian R, Wang M, Wang X, Jiang J, Zhang Z, et al. CD44+ CD133+ population exhibits cancer stem cell-like characteristics in human gallbladder carcinoma. *Cancer Biol Ther.* (2010) 10:1182–90. doi: 10.4161/cbt.10.11.13664
20. Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133 (+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett.* (2010) 289:151–60. doi: 10.1016/j.canlet.2009.08.010
21. Angelastro JM, Lame M. Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells. *Mol Cancer Res.* (2010) 8:1105–15. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0383
22. Tumor M, Lilly P, Bourguignon W. CD44 in cancer progression: adhesion. *Migr Growth Regul.* (2004) 35:211–31. doi: 10.1023/B:HIJO.0000032354.94213.69
23. Kuhn S, Koch M, Nübel T, Ladwein M, Antolovic D, Klingbeil P, et al. A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res.* (2007) 5:553–67. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0384
24. Reeder JA, Gotley DC, Walsh MD, Fawcett J, Antalis TM. Expression of antisense CD44 variant 6 inhibits colorectal tumor metastasis and tumor growth in a wound environment expression of antisense CD44 variant 6 inhibits colorectal tumor metastasis and tumor growth in a wound environment1. *Cancer Res.* (1998) 58:3719–26.
25. Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, et al. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2000) 97:5735–9. doi: 10.1073/pnas.100471497
26. Pardo M, Lang B, Yu L, Prosser H, Bradley A, Babu MM, et al. An expanded Oct4 interaction network: implications for stem cell biology, development, and disease. *Cell Stem Cell.* (2010) 6:382–95. doi: 10.1016/j.stem.2010.03.004
27. Olivier-Van Stichelen S, Hanover JA. You are what you eat: O-linked N-acetylglucosamine in disease, development and epigenetics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* (2015) 18:339–45. doi: 10.1097/MCO.0000000000000188
28. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* (1956) 123:309–14. doi: 10.1126/science.123.3191.309
29. Rozanski W, Krzeslak A, Forma E, Brys M, Blewniewski M, Wozniak P, et al. Prediction of bladder cancer based on urinary content of MGEA5 and OGT mRNA level. *Clin Lab.* (2012) 58:579–83.
30. Mi W, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, et al. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta.* (2011) 1812:514–9. doi: 10.1016/j.bbdis.2011.01.009
31. Itkonen HM, Engedal N, Babsa E, Luhr M, Guldvik JJ, Minner S, et al. UAP1 is overexpressed in prostate cancer and is protective against inhibitors of N-linked glycosylation. *Oncogene.* (2015) 34:3744–5032. doi: 10.1038/onc.2014.307
32. Chatham JC, Marchase RB. Protein O-GlcNAcylation: a critical regulator of the cellular response to stress. *Curr Signal Transduct Ther.* (2010) 5:49–59. doi: 10.2174/157436210790226492
33. Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem.* (2004) 279:30133–42. doi: 10.1074/jbc.M403773200
34. Liu J, Pang Y, Chang T, Bounelis P, Chatham JC, Marchase RB. Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* (2006) 40:303–12. doi: 10.1016/j.yjmcc.2005.11.003

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer EZ declared a shared affiliation, with no collaboration, with several of the authors GF-G, MC-P and MR-F to the handling Editor.

Copyright © 2019 Fuentes-García, Castañeda-Patlán, Vercoutter-Edouart, Lefebvre and Robles-Flores. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# LA FUNCIÓN DE LA O- $\beta$ -N ACETILGLUCOSAMINA (O-GlcNAc) EN LOS PROCESOS DE ENFERMEDAD\*

Gabriela Fuentes-García<sup>1</sup>, Cristina Patlán-Castañeda<sup>1</sup>,  
Tony Lefebvre<sup>2</sup> y Martha Robles-Flores<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. CDMX, México.  
<sup>2</sup>UMR CNRS 8576, Université de Lille. Lille, France. <sup>3</sup>Autor de correspondencia: rmartha@unam.mx

## RESUMEN

La O-GlcNAcilación es una glicosilación no-canónica que consta de la unión del motivo O-GlcNAc en las serinas y treoninas de diversas proteínas. Ya que la producción de O-GlcNAc depende del flujo de glucosa, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos, se ha postulado como un sensor del estatus nutricional de la célula. Sin embargo, la literatura que describe su papel en la regulación de diversos procesos celulares ha incrementado de forma importante desde su descubrimiento. Por lo que ahora, no solo es considerado como un sensor nutricional, sino como una modificación postraduccional que interacciona con otras como la fosforilación, metilación, ubiquitinación para mantener la homeostasis celular. Asimismo, se ha descrito ampliamente que el desequilibrio en los niveles de O-GlcNAc se ha asociado con diversas patologías. Debido a lo anterior, el objetivo de esta revisión es describir algunos de las principales funciones que desempeña la O-GlcNAcilación durante diversas patologías y procesos celulares.

## ABSTRACT

O-GlcNAcylation is a non-canonical glycosylation that consists of a linkage of O-GlcNAc motif to Serine and Threonine residues of different proteins. Since O-GlcNAc depends on the flux of glucose, amino acids, fatty acids, and nucleotides, it has been postulated as a nutrient status sensor within the cell. However, literature describing its role in the regulation of several cellular processes has greatly increased since the discovery of O-GlcNAc. Now, O-GlcNAc is not only considered as a nutritional sensor, but as a posttranslational modification (PTM) which interacts with other PTMs, such as phosphorylation, methylation, ubiquitinylation to maintain cellular homeostasis. Likewise, it has been widely described that a disturbance in the levels of O-GlcNAc is associated with several pathologies. Thus, the present review is aimed to summarize some of the main roles of O-GlcNAcylation during different pathologies and cellular processes.

## PALABRAS

**CLAVE:**  
O-GlcNAc,  
modificación  
postraduccional,  
cáncer,  
diabetes,  
falla cardíaca.

## KEY WORDS:

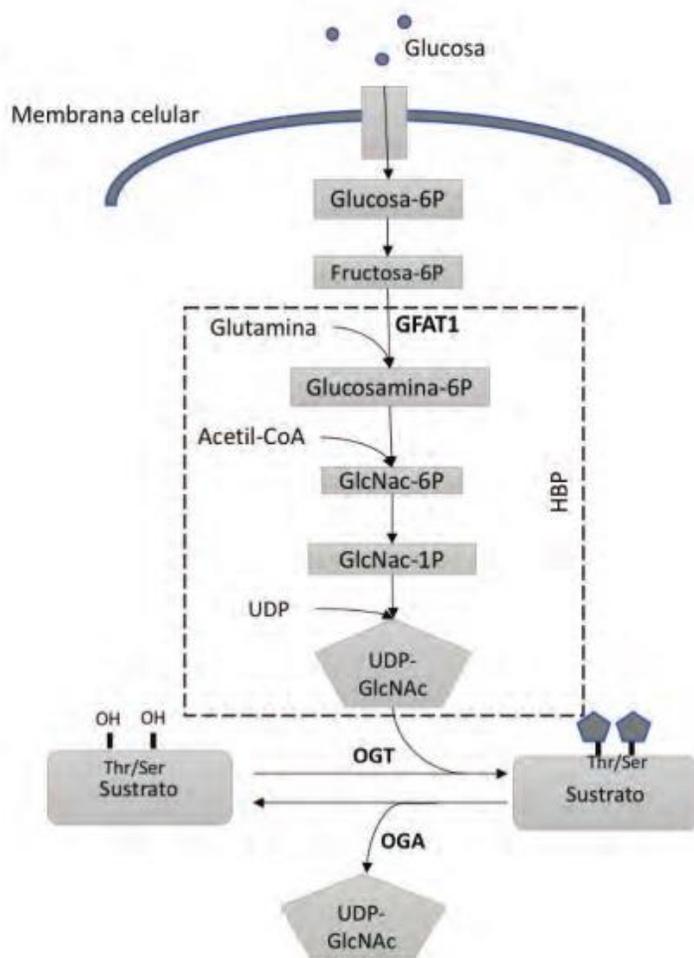
O-GlcNAc,  
post-translational  
modification,  
cancer,  
diabetes,  
cardiac failure.

## Introducción

La O-GlcNAcilación es una modificación postraduccional (PTM, post-translational modification, por sus siglas en inglés) que consta de la unión entre el grupo hidroxilo de la serina o treonina de proteínas citoplasmáticas, nucleares y mitocondriales y la N-acetil-glucosamina (GlcNAc) a

través de un enlace  $\beta$ -glucosídico (1). O-GlcNAc proviene del sustrato Uridina-Difosfato-GlcNAc (UDP-GlcNAc) que es el producto final del flujo de nutrientes a través de la vía biosintética de las hexosaminas (HBP, Hexosamine Biosynthetic Pathway), la cual integra el metabolismo de glucosa, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos. Solo existen dos enzimas responsables de

\*Recibido: 11 de octubre de 2020    Aceptado: 13 de abril de 2021



**Figura 1. El flujo de nutrientes a través de la vía Biosintética de las Hexosaminas (HBP) regula la O-GlcNAcilación.** La glucosa entra a la célula desde el medio extracelular por las proteínas transportadoras de glucosa (GLUT, Glucose Transporter). Mientras que la mayoría de la glucosa que ingresa a la célula se usa para la glucólisis y la síntesis de glucógeno, aproximadamente de 2-5% de la glucosa se destina a HBP. GFAT1 (Glutamine-Fructose-6-Phosphate Amidotransferase 1) cataliza el paso limitante de HBP, el cual convierte a la fructosa-6-fosfato en glucosamina-6-fosfato. Una subsecuente acetilación y uridilación produce el sustrato para la O-GlcNAcilación, Uridina-Difosfato-GlcNAc. O-GlcNAc Transferasa (OGT) y O-GlcNAcasa (OGA) catalizan la adición y remoción de O-GlcNAc, respectivamente.

catalizar la adición y la remoción de O-GlcNAc: O-GlcNAc Transferasa (OGT), la cual cataliza la transferencia del GlcNAc desde el sustrato donador UDP-GlcNAc a los grupos hidroxilo de residuos de Ser y Thr de proteínas blanco; y O-GlcNAcasa (OGA), que cataliza la hidrólisis de la modificación (2). Ya que la producción de O-GlcNAc requiere de diversos nutrientes derivados de otras vías metabólicas, se ha propuesto que la O-GlcNAcilación es un sensor metabólico y nutricional (Fig. 1). Sin embargo, evidencia creciente indica que interviene en la regulación de procesos celulares como la transcripción de genes, la traducción de proteínas, algunas vías de señalización, el metabolismo, la apoptosis; entre otros. A diferencia de las glucosilaciones

canónicas, la glucosilación mediante O-GlcNAc es muy dinámica y frecuentemente es trascendente en respuesta a diversas señales ambientales y fisiológicas. Incluso, se ha reportado que interacciona con otras PTMs, como la fosforilación, la ubiquitinación, la acetilación y la metilación (3). Gracias al desarrollo de diversas tecnologías que han permitido identificar la O-GlcNAcilación de proteínas específicas, se ha descrito que el número de proteínas modificadas en células humanas ha incrementado de algunos cientos a cerca de 4000, y la lista sigue en aumento (4). En este artículo se resumen algunas de las funciones que desempeña la O-GlcNAcilación en diferentes procesos biológicos, como la regulación de la función de diversas proteínas, y se describe el

papel que juega en algunas patologías como el cáncer y la enfermedad de Alzheimer.

### **O-GlcNAc y su interacción con proteínas nucleares**

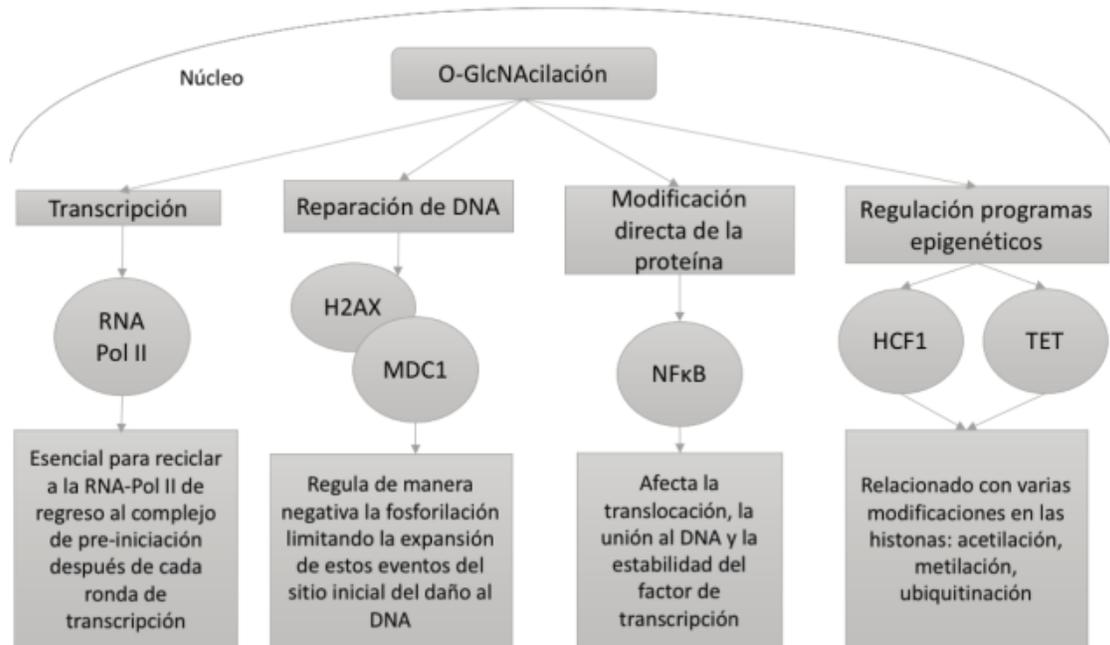
Entre las proteínas que son modificadas por O-GlcNAc, cerca del 25% de ellas son factores de transcripción o proteínas que están involucradas en la regulación de la expresión génica (5). La O-GlcNAcación de estas proteínas puede determinar su localización subcelular, su interacción con otras proteínas, la fosforilación por proteínas cinasas para determinar su actividad, o incluso determinar su capacidad de unión a DNA en respuesta a ciertos estímulos fisiológicos (6). Desde hace décadas se mostró que la RNA polimerasa II (Pol II) se modifica por O-GlcNAc (7). El dominio C-Terminal (CTD) de RNA-Pol II se fosforila y es O-GlcNAcado recíprocamente en las Ser2 y Ser5; la RNA-Pol II que está O-GlcNAcada está enriquecida en sitios de inicio de la transcripción lo que permite el ensamblaje del complejo de pre-iniciación, mientras que la remoción de O-GlcNAc del CTD promueve la fosforilación necesaria durante el inicio de la transcripción y la elongación (8, 9). Se ha propuesto que, en genes activamente transcritos, la acción secuencial de OGT y OGA es esencial para reciclar a la RNA-Pol II de regreso al complejo de pre-iniciación después de cada ronda de transcripción y se ha sugerido que en el núcleo ambas enzimas pueden formar un complejo que interactúe de forma eficiente con sus proteínas blanco (3). También, existe evidencia que sugiere que la O-GlcNAcación está involucrada con vías de reparación del DNA. Se ha mostrado que la enzima Topoisomerasa I (Topo I) se une a OGT y es O-GlcNAcada. Se observó que al incrementar los niveles de O-GlcNAc, se incrementa también la actividad de Topo I (10). Asimismo, se ha descrito que OGT se reposiciona en los sitios de daño en el DNA y regula de manera negativa la fosforilación (inducida por el rompimiento de la doble cadena del DNA) de la histona H2AX y de la proteína MDC1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint) limitando así la expansión de los eventos de fosforilación del sitio inicial del daño al DNA (11). Por otro lado, se observó que la O-GlcNAcación de CRT2, FOXO1 y PGC1 modula la expresión de genes involucrados en la gluconeogénesis en hepatocitos (12, 13, 14). Además, afecta la translocación, la unión al DNA y la estabilidad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B a través de la O-GlcNAcación de la subunidad p65. Esto disminuye la unión del inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  e incrementa la translocación y la actividad trans-

cripcional mientras que la O-GlcNAcación de c-REL es esencial para la unión al DNA (15, 16).

Aproximadamente el 50% de OGT en el núcleo existe en complejo con HCF1, por lo que OGT se ha relacionado con varias modificaciones en las histonas (17). Se ha demostrado que el complejo OGT-HCF1 (Host Cell Factor 1) interactúa con la proteína 1 asociada a BRCA1 (BAP1), un componente del complejo PR-DUB que desubiquitila la histona H2A (18). Asimismo, OGT se requiere para la trimetilación de la histona H3 en la Lys27, probablemente porque estabiliza la metiltransferasa de histonas EZH2 y mantiene la integridad del complejo represivo PCR2 (19, 20). También, se demostró que la O-GlcNAcación de H2B facilita su mono-ubiquitinación, proceso que se ha asociado con la transcripción activa de genes (21). Más aún, OGT se asocia con el complejo co-represor deacetylase de histonas SIN3A y se ha propuesto que la O-GlcNAcación de los factores de transcripción y de RNA-Pol II actúen en paralelo con la deacetilación de las histonas para promover el silenciamiento de genes (22). De forma similar, se ha demostrado que OGT existe en complejo con las proteínas TET (Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase, por sus siglas en inglés), las cuales regulan la desmetilación del DNA a través de la oxidación sucesiva de 5-metil-citocina. Algunos estudios indican que las proteínas TET facilitan el reclutamiento de OGT a la cromatina para incrementar la O-GlcNAcación de las histonas, mientras que otros sugieren que OGT puede modificar directamente a las proteínas TET y modular su estabilidad o localización nuclear (23, 24). TET1 se une a OGT y es O-GlcNAcada, promoviendo el transporte nuclear de TET1 y la inhibición de la formación de 5-hidroximetilcitosina (25). TET2 y TET3 también se unen a OGT y se O-GlcNAcan lo que a su vez facilita la O-GlcNAcación de H2B (26). Por lo que, a nivel del núcleo, OGT podría estar regulando programas epigenéticos de las histonas al modular su acetilación, ubiquitinación y metilación, pero la relación que existe entre las enzimas que modifican a las histonas y OGT, aún necesita ser dilucidada (Fig. 2).

### **O-GlcNAc y los sistemas de protección celular**

Las células y los tejidos responden a los daños fisiológicos y ambientales a través de la reprogramación en la transcripción, traducción, metabolismo y señalización para reparar el daño para sobrevivir, o si es necesario, promover la muerte celular programada. De forma colectiva, esta reprogramación celular también es conocida como respuesta celular al estrés y se caracteriza por la inducción de chape-



**Figura 2. La O-GlcNAc en el núcleo afecta diversos procesos esenciales para la célula.** OGT y OGA interactúan con diversas proteínas y su papel es fundamental en dichos procesos, además se ha descrito su interacción con otras modificaciones post-traduccionales.

ronas, conocidas como proteínas de choque térmico HSP (Heat Shock Protein) (27, 28, 29). En mamíferos, esta respuesta es mediada por 6 grupos de proteínas muy relacionadas: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y las pequeñas HSPs, que están reguladas transcripcionalmente por HSF1 (Heat Shock Transcription Factor 1) (30). Se ha observado que la elevación inducida por estrés de los niveles de O-GlcNAc cumple con una función protectora contra el daño celular a través del incremento en los niveles de HSPs, incluyendo HSP70 y HSP90 (31). En fibroblastos de embrión de ratón, al disminuir los niveles de O-GlcNAc, se observó una disminución en la expresión de HSP70 y HSP40 (32). Asimismo, en ratones y en cardiomiocitos de rata aislados, el incremento del flujo de la vía HBP a través de tratamiento con glutamina para elevar O-GlcNAc promovió la expresión de HSF1 y HSP70 (33). Además de estar involucrada con la expresión de las HSPs, se reveló que HSP70 y HSP90 están O-GlcNAcadas (34, 35); HSP70 mostró una actividad de reconocimiento y unión hacia motivos específicos de O-GlcNAc, de manera similar a las lectinas (36), mientras que la inhibi-

ción de HSP90 desestabiliza a OGT y reduce los niveles de O-GlcNAc (37). Debido a lo anterior, se ha sugerido que la O-GlcNAc reduce el estrés celular a través de diversos mecanismos: inducción transcripcional de las HSPs, estabilización proteica a través de la O-GlcNAc directa y reclutamiento de las HSP a blancos específicos modificados por O-GlcNAc a través de la actividad similar a lectina en el caso de HSP70 (38). Por otro lado, también se ha demostrado que O-GlcNAc mitiga el estrés del retículo endoplásmico (RE) a través de la formación de gránulos de estrés y cuerpos de procesamiento, los cuales regulan la traducción de mRNA y su degradación (39). OGT y HSP son esenciales para el ensamblaje correcto inducido por estrés de dichos gránulos y algunas proteínas O-GlcNAcadas, como RACK1, GAPDH y subunidades ribosomales, son reclutadas de forma subsecuente en ellos (40).

**O-GlcNAc y la resistencia a la insulina**

Ya que se ha implicado a la O-GlcNAc en la patogénesis de la resistencia a la insulina, el efecto

de la estimulación por insulina en la señalización de O-GlcNac está ampliamente estudiado (15). La sobreexpresión de OGT en tejido muscular y adiposo promueve resistencia a la insulina e hiper-leptinemia (41), así como la inhibición de OGA por PUGNac (O-(2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosilideno) amino-N-fenilcarbamato,) también promueve la resistencia a la insulina en cultivo celular (42, 43, 44). Se ha demostrado que la señalización por insulina regula a OGT a través de diversos mecanismos, como la modulación de su expresión, su localización subcelular y su actividad enzimática. Además de regular de forma positiva la expresión de OGT a través de la vía dependiente de PI3K (Fosfoinositido 3-Cinasa), la estimulación por insulina promueve la translocación de OGT del núcleo al citoplasma y después a la membrana plasmática en balsas lipídicas donde es activada a través de su fosforilación por el receptor de insulina (45). También, se ha mostrado que la elevación de los niveles de O-GlcNacilación (a través de PUGNac) en adipocitos en cultivo bloquea la fosforilación de AKT estimulada por insulina (42). De manera contraria, la sobreexpresión de OGA en células de hepatoblastoma HepG2 provocó una disminución en la O-GlcNacilación de AKT, aumentando su fosforilación y su actividad (46). Anteriormente, los sitios de O-GlcNacilación en AKT ya habían sido identificados en Thr308 y Ser473, los cuales también son sitios cruciales para su fosforilación y activación, por lo que se ha sugerido que la O-GlcNacilación y la fosforilación de AKT compiten directamente (47). Así mismo, se ha descrito que después de una estimulación prolongada de insulina, PIP<sub>3</sub> (Fosfatidilil Inositol 3, 4, 5 trisfosfato) recluta a OGT (la cual posee un motivo de unión a PIP<sub>3</sub>) a la membrana plasmática donde O-GlcNacila e inhibe a varios componentes de la vía de señalización de la insulina, lo cual gradualmente atenúa la cascada de señalización (15). Finalmente, se ha reportado que un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen que codifica OGA, MGEA5 (Meningioma Expressed Antigen 5, por sus siglas en inglés) se ha asociado con un riesgo incrementado de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 en una población México-Americana (48).

### O-GlcNac y cáncer

Las células cancerosas se caracterizan por presentar un metabolismo basado en glucólisis, y no en fosforilación oxidativa, como principal fuente de energía aún en presencia de oxígeno, fenómeno conocido como efecto Warburg. Este cambio en el metabolismo celular es impulsado por la hipoxia presente dentro del tumor y por mutaciones en

oncogenes y supresores tumorales (49). Estas mutaciones promueven una regulación positiva de las enzimas glucolíticas y transportadores de glucosa, lo que a su vez incrementa la ingesta de glucosa en estas células (50). La abundancia de glucosa en el citoplasma no solo contribuye al incremento de glucólisis, sino que también incrementa el flujo de algunas ramas de la vía, incluyendo la vía de las pentosas fosfato y la de biosíntesis de hexosamina (Hexosamine Biosynthetic Pathway, por sus siglas en inglés). De hecho, ciertos oncogenes como *Kras* regulan de forma positiva no solo los niveles de los transportadores de glucosa, sino también de otras enzimas como GFAT1 (glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa 1), que es la enzima limitante en la vía HBP (51). Asimismo, las células cancerosas son adictas a glutamina ya que la consumen a tasas elevadas *in vivo* en comparación con las células no transformadas, por lo que la requieren en altas concentraciones para sobrevivir y proliferar (52). Los oncogenes también regulan de forma positiva la ingesta de glutamina; por ejemplo, *c-Myc* promueve la expresión elevada de los transportadores de glutamina (54). La glutamina es el sustrato donador en la conversión de fructosa-6-fosfato a glucosamina-6-fosfato mediante GFAT en la vía HBP. Por lo que el incremento en la ingesta de glucosa debido al efecto Warburg, así como el incremento de la ingesta de glutamina, cooperan para provocar un incremento en el flujo de HBP, contribuyendo finalmente a un incremento en las concentraciones de UDP-GlcNac (55), sustrato donador de la OGT. Confirmando lo anterior, se han observado niveles de O-GlcNacilación aberrante con una tendencia al incremento, fenómeno conocido como hiper-O-GlcNacilación en diferentes tipos de cáncer: en cáncer de mama (56, 57), de próstata (58), de pulmón (59), colo-rectal (59, 60), de hígado (61), y en leucemia linfocítica crónica (62). Existe evidencia creciente que ha mostrado una relación entre los niveles de O-GlcNac y diversas características distintivas del cáncer, como angiogénesis y metástasis; además, muchos supresores tumorales y oncogenes conocidos por ser iniciadores clave del fenotipo maligno canceroso, están regulados por O-GlcNac (p53, NFκB, *c-Myc*, HIF-1 y AKT) (63). En el hígado se ha descrito que la hexocinasa IV (o también conocido como glucocinasa, GK) es modificada dinámicamente por O-GlcNac incrementando su estabilidad, lo que a su vez incrementa la ingesta de glucosa (64). Así mismo, se ha sugerido que la O-GlcNacilación de PKM2 incrementa su propia expresión, ya que posee una señal inducible de localización nuclear, su elevada expresión incrementa los niveles de producción de piruvato y ATP mediante glicólisis,

lo cual es típico de las células cancerosas (65, 66). Por otro lado, existe evidencia que indica que la angiogénesis tumoral puede mantenerse en parte debido a O-GlcNAc ya que al reducir los niveles de O-GlcNAc en la línea celular cancerosa de próstata PC-3ML por knock-down de OGT se inhibe tanto la expresión de VEGF como la angiogénesis *in vitro*. Mas aún, la reducción de la hiper-O-GlcNAcilación en la misma línea PC-3ML y en las células cancerosas HEPG2, suprime la expresión de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 (67, 61). De forma interesante, se ha demostrado que al incrementar los niveles de O-GlcNAc se promueve la migración/invasión de células cancerosas de mama y próstata mientras que disminuir los niveles por knock-down de OGT, inhibe la invasión tumoral y metástasis (56, 57). Uno de los mecanismos que contribuye al desarrollo de metástasis es la transición epitelio-mesénquima (EMT) (68, 69). Este proceso promueve la pérdida de marcadores epiteliales como E-cadherina y la ganancia de marcadores mesenquimales como vimentina y N-cadherina (70). Se ha demostrado que reducir los niveles de hiper-O-GlcNAcilación en cáncer incrementa la expresión de E-cadherina y disminuye la expresión de vimentina mientras que elevarlos disminuye la expresión de E-cadherina en células de cáncer y mama (57, 55, 71). Además, se ha descrito que la O-GlcNAcilación de E-cadherina en su dominio citoplasmático durante el estrés de RE bloquea su transporte a membrana celular, inhibiendo la adhesión celular (72); mientras que la O-GlcNAcilación directa de Snail (el factor transcripcional que se une al promotor de E-cadherina) en la Ser112 lo estabiliza causando la represión de la expresión de E-cadherina, potencialmente originando migración/metástasis (71). La O-GlcNAcilación de Myc se lleva a cabo en Thr58, un residuo que se encuentra en el dominio de transactivación de la proteína y esta modificación promueve un incremento en la capacidad de transformación y de formación de tumor en células de linfoma (73). También se ha descrito que c-Myc se encuentra modificado por O-GlcNAc y probablemente esté estabilizado, resultando en un mal pronóstico y recurrencia en muestras clínicas de pacientes con cáncer de próstata (74). En células de Leucemia linfocítica crónica, los niveles de O-GlcNAcilación se encuentran elevados y se ha sugerido que esto contribuye a la patogénesis de la enfermedad. Comparado con las células B circulantes normales, en las células de leucemia hay un incremento en la O-GlcNAcilación de p53, de AKT y de c-Myc (62). El mismo fenómeno fue observado en las células pre-B de leucemia linfocítica aguda (75). También se ha reportado en ambos tipos de leucemia que la

O-GlcNAcilación específica de STAT5 en Thr92 promueve la fosforilación de tirosinas y la proliferación neoplásica de las células mieloides (76).

### O-GlcNAc y la función cardíaca

Durante la falla cardíaca existen cambios metabólicos que promueven la utilización de diferentes sustratos y la reversión a un perfil metabólico fetal; el corazón suprime la oxidación de ácidos grasos y aumenta su dependencia a la oxidación de carbohidratos (77, 78). Lo anterior, resulta en un incremento del flujo de la glucosa que entra a la vía HBP, lo cual deriva en un incremento en los niveles de O-GlcNAc en cardiomiocitos. Se observó que en modelos de sobre carga de presión por hipertrofia, las concentraciones de UDP-GlcNAc están incrementadas y los niveles de O-GlcNAc y GFAT incrementan en hipertrofia cardíaca relacionada con la edad (79, 80). Además, durante la hipertrofia de cardiomiocitos se observó una activación de NFAT dependiente de O-GlcNAc; la O-GlcNAcilación de NFAT promueve hipertrofia, mientras que la inhibición de O-GlcNAc la reduce (81). Así mismo, se reportó un incremento en los niveles de O-GlcNAcilación y en la expresión de OGT durante la falla cardíaca en ratones; en este modelo de infarto inducido por falla cardíaca, la expresión de OGT es elevada mientras que la de OGA está disminuida (82). Además, se observó que la hiperglicemia induce un incremento en la O-GlcNAcilación de proteínas mitocondriales en cardiomiocitos, lo cual se asoció con una disfunción mitocondrial, movilización de calcio y disminución en los depósitos de ATP. También, se mostró que varias proteínas mitocondriales como NDUFA9 del complejo I, las subunidades 1 y 2 del complejo III y la subunidad I codificada por DNA mitocondrial del complejo IV (COX I) se encuentran O-GlcNAciladas (83). O-GlcNAc no solo afecta a la función mitocondrial, sino también a la función contráctil cardíaca a través de la alteración de los depósitos de calcio. Al tratar cardiomiocitos con altas concentraciones de glucosa, glucosamina o PUGNAc, se promovió un retraso en la liberación de calcio; la sobreexpresión de OGT exagera este efecto, mientras que la sobreexpresión de OGA lo abate (84; 85, 86). Mas aún, durante el desarrollo de diabetes, la O-GlcNAcilación en la Ser16 de PLN (Phospholamban, por sus siglas en inglés, fosfoproteína asociada al RE que regula el transporte de calcio en las células musculares cardíacas) está incrementada. Esto reduce su fosforilación y su asociación con SERCA2a, promoviendo una disminución en la actividad de la bomba y afectando a los depósitos de calcio (87, 88). Debido a lo anterior, se ha propuesto

que el incremento de O-GlcNAcilación durante la hiperglicemia puede ser parte de patología del fallo cardiaco, ya sea a nivel mitocondrial, o por la alteración en los depósitos de calcio (89). Sin embargo, también se ha observado que la O-GlcNAcilación confiere protección subsecuente a daños letales; por ejemplo, en respuesta al daño al miocardio por isquemia/perfusión, el cual se caracteriza por un aumento en los niveles de calcio, estrés oxidativo y estrés de RE, los niveles de O-GlcNAcilación se encuentran aumentados. Además, los niveles de O-GlcNAc disminuyen durante hipoxia y después incrementan en la re-oxigenación de corazones sometidos a isquemia simulada. Se observó el mismo efecto en cardiomiocitos de ratas neonatales, en donde esta elevación en la O-GlcNAcilación redujo la muerte celular (90-96). Algunos de estos efectos protectores se originan en la mitocondria donde O-GlcNAc es necesario para mantener el potencial de membrana mitocondrial y prevenir la formación de poro mitocondrial de transición. Uno de los mecanismos por los que estos efectos pueden ocurrir es mediante la O-GlcNAcilación directa y la regulación de los canales aniónicos dependientes de voltaje, que regulan el flujo de calcio a través de la mitocondria (94,96). Además, aumentar los niveles de O-GlcNAc promueve la supervivencia de las células troncales cardiacas, mientras que una reducción de los niveles a través de la inhibición farmacológica o una delección genética las sensibiliza al daño causado por hipoxia (97). De forma similar, el incremento de los niveles de O-GlcNAc, también protege a los cardiomiocitos de la muerte celular en respuesta al estrés del RE. Esta protección se asoció con la disminución en la expresión de las proteínas involucradas en la respuesta desadaptativa, que incluyen a las chaperonas de plegamiento enzimático GRp74, GRp90 y a CHOP (CCAAT/enhancer-Binding Protein Homologous Protein) (98).

### **O-GlcNAc y la función neural**

La O-GlcNAcilación se encuentra de forma permanente en el cerebro, pero su significado en la regulación de las funciones neuronales aún necesita ser dilucidada. Sin embargo, se ha observado que mantener los niveles de O-GlcNAc a un nivel adecuado es vital para prevenir las funciones neuronales aberrantes (99). Esta posibilidad se evidencia por el hecho de que el incremento o la disminución en los niveles de O-GlcNAc conlleva a un déficit en el aprendizaje dependiente del hipocampo (100, 101, 102), lo cual no es sorprendente dado que el hipotálamo es una de las regiones del cerebro con los niveles más altos de expresión de OGT y OGA

en el cuerpo. Otra región con alta expresión de OGT y OGA es la amígdala, un área central que se involucra con el miedo y la ansiedad, sin embargo, la función fisiológica de la O-GlcNAcilación en la amígdala no está bien comprendida (102, 103). Algunos estudios han reportado que O-GlcNAc regula la maduración y el desarrollo neuronal. En cultivos primarios de neuronas corticales, el silenciamiento de OGT conlleva a una reducción significativa del número de sinapsis y al incremento de la proporción de espinas inmaduras (104). De forma notable, la delección específica de OGA en el cerebro de ratones, promueve un desarrollo retardado del cerebro y un desequilibrio entre la proliferación y la diferenciación neuronal. Igualmente, la habilidad de diferenciación de las células troncales embrionarias derivadas de estos ratones se vio dramáticamente suprimida (105). Mas aún, O-GlcNAcilación del factor de transcripción CREB (Cyclic AMP-Response Element Binding Protein) podría regular el crecimiento neuronal. Esta proteína es O-GlcNAcilada en la Ser40 en respuesta a la actividad neuronal, y se mostró que su glicosilación suprime la transcripción mediada por CREB. Cuando el residuo Ser40 es mutado por alanina, las neuronas desarrollan axones y dendritas muy largas. El silenciamiento de OGT facilita el crecimiento de los axones en el cultivo de neuronas corticales, mientras que la sobreexpresión de OGT suprime su crecimiento, indicando que la O-GlcNAcilación de CREB inhibe el crecimiento neuronal (106). Por otro lado, las neuronas AgRP (Agouti-Related Protein, por sus siglas en inglés) en el hipotálamo controlan la ingesta de comida y se ha observado que la privación de alimentos incrementa la expresión de OGT y los niveles de O-GlcNAc en estas neuronas (107). La delección específica de OGT reduce la tasa de los potenciales de acción en las neuronas AgRP, indicando que la disminución de O-GlcNAc suprime la excitabilidad intrínseca neuronal; este cambio es mediado por la O-GlcNAcilación directa de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kcnq3) y el silenciamiento de OGT causa una reducción en las corrientes de potasio (108). Por otro lado, OGT y OGA están presentes en las sinapsis neuronales y OGT está particularmente enriquecida en la zona de densidad postsináptica de sinapsis excitatorias en comparación con OGA (104). Muchas de las proteínas de sinapsis están O-GlcNAciladas, lo cual ha sugerido que un cambio en los niveles podría modular la fuerza de transmisión sináptica o la posible liberación de neurotransmisores en las terminales presinápticas (109, 110). Por otro lado, el papel de la O-GlcNAcilación también se ha descrito ampliamente en algunas patologías del sistema nervioso. Tau es una proteína asociada a

microtúbulos abundante en neuronas, la cual se une y estabiliza microtúbulos (111). Se han reportado diversos sitios de fosforilación de tau (112, 113) y su fosforilación juega un papel determinante en la regulación de sus funciones fisiológicas, incluyendo su dinámica con los microtúbulos, el transporte en axones, la transmisión sináptica y la estabilización del DNA (114-118). Cuando está hiper-fosforilada, tau pierde su afinidad por los microtúbulos y la proteína que se libera forma agregados conocidos como ovillos neurofibrilares, los cuales, son considerados como la verdadera razón de la neurotoxicidad asociada a tau y el desarrollo de déficits cognitivos (113). De forma interesante, la elevación de los niveles de O-GlcNAcilación de tau, por inhibición de OGA, conlleva a una disminución dramática de la fosforilación de tau y suprime su agregación, mientras que la inhibición de OGT desencadena el efecto opuesto (119). La característica principal de la enfermedad de Alzheimer es la formación de placas extracelulares compuestas por la proteína  $\beta$ -amiloide y ovillos neurofibrilares intracelulares compuestos por tau hiper-fosforilada (120-121).  $\beta$ -amiloide también está O-GlcNAcilada y se observó que elevar los niveles de O-GlcNAc incrementa el procesamiento no-amiloide de la proteína por lo que se reduce la producción de  $\beta$ -amiloide (122-123). Asimismo,  $\alpha$ -sinucleína es otro ejemplo de un agregado proteico tóxico y está enriquecido en las terminales sinápticas del cerebro. Su agregación se asocia con la enfermedad de Parkinson (124). De forma similar a tau, la O-GlcNAcilación de  $\alpha$ -sinucleína inhibe la formación de agregados tóxicos lo cual afianza la función protectora de la O-GlcNAcilación en la prevención de agregados proteicos (125). Estos resultados sugieren el efecto protector de la O-GlcNAcilación en enfermedades neurodegenerativas, y este efecto también se apoya en algunos otros hallazgos, por ejemplo, al silenciar OGT en neuronas corticales de ratones, se promueve la neurodegeneración junto a una reducción en el tamaño del cerebro. Estos ratones también mostraron niveles elevados de  $\beta$ -amiloide y altos niveles de fosforilación de tau. Más aún, en muestras de tejido cerebral *post-mortem* de pacientes humanos con la enfermedad de Alzheimer, los niveles de OGT están reducidos significativamente (121), lo cual indica una unión cercana entre la O-GlcNAcilación aberrante y la etiología de la enfermedad de Alzheimer.

### O-GlcNAc y las células troncales

En la literatura se ha reportado que el estado nutricional y el microambiente median las señales que determinan los cambios que regulan la

capacidad de auto-renovación y la diferenciación en las células troncales. Se ha observado que las células troncales embrionarias (ESC) (126), las células troncales hematopoyéticas (HSC) (127), las células troncales mesenquimales (MSC) (128) y las células troncales hepáticas (129) basan su metabolismo en la glucólisis como su principal fuente de energía. Además, está bien establecido que las células troncales que se originan en nichos hipóxicos tienden a tener una actividad glucolítica incrementada como resultado de una ingesta incrementada de glucosa en condiciones anaerobias (130). Más aún, se ha demostrado que la estimulación de la glucólisis a través de la hipoxia en células troncales pluripotentes (131), la inhibición de la respiración mitocondrial (132) o la suplementación con insulina (133) promueven la troncalidad mientras que la inhibición de la glucólisis impide la proliferación y precipita la muerte celular (134). Además de la glucosa, la glutamina también es ingerida activamente por las células troncales embrionarias (135) y como ya se mencionó anteriormente, esto promueve un aumento en el flujo a la vía HBP, un aumento en la concentración de UDP-GlcNAc y el subsecuente incremento de los niveles de O-GlcNAc. Ya que la actividad de OGT es dependiente del flujo de nutrientes y que a su vez el metabolismo influye en la capacidad de auto-renovación característica de las células troncales, se ha hipotetizado que OGT es un determinante clave entre los genes de auto-renovación y su interconexión con el estatus metabólico de la célula (136). Se ha demostrado que la completa pérdida de OGT resulta en la letalidad de las ESC, por lo que la función de O-GlcNAc es crítica para el mantenimiento de la capacidad de autorenovación y la pluripotencia (137). Además, se mostró que bloquear O-GlcNAc lleva a la inhibición de la capacidad de auto-renovación de ESC mientras que incrementar los niveles inhibe la diferenciación (138). Los factores de transcripción conocidos como "factores de Yamanaka" (Sox2, OCT4, Myc y KLF4) son considerados como las proteínas críticas que regulan la troncalidad y la capacidad de auto-renovación (139), y todos estos factores están modificados por O-GlcNAc, lo cual influye en su actividad. Además de regular transcripcionalmente a la capacidad de auto-renovación y a la diferenciación de las células troncales, O-GlcNAc también regula la troncalidad a un nivel epigenético. Un aumento en la O-GlcNAcilación promueve la regulación positiva de genes que normalmente están silenciados en ESC, apoyando el rol emergente de esta modificación postraduccional en la regulación de las modificaciones de las histonas y la metilación del DNA (140).

### O-GlcNAc y la regulación del sistema inmune

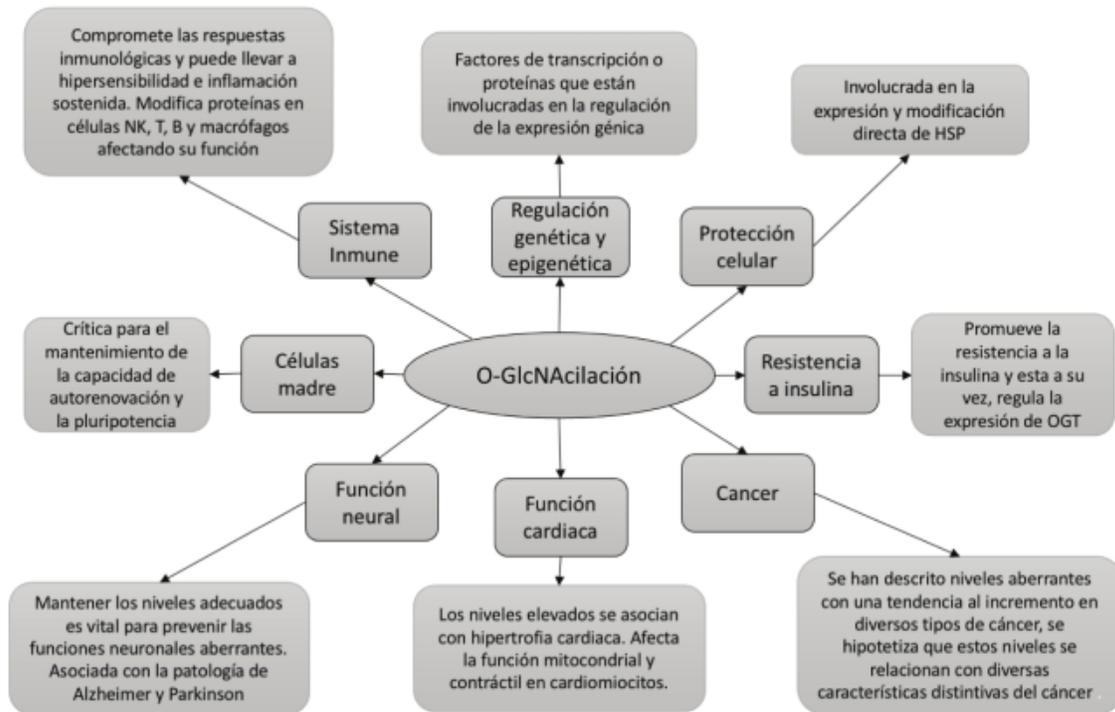
En años recientes se ha demostrado que la O-GlcNAcilación puede tener efectos importantes en el sistema inmune, comprometiendo las respuestas inmunológicas o llevando a una hipersensibilidad e inflamación sostenida (141-143). Esta modificación se ha reportado en diversas células del sistema inmune, como macrófagos, células NK, células T y células B. Se ha mostrado que la O-GlcNAcilación disminuye durante la citotoxicidad de las células NK y se ha sugerido que está involucrada en la traducción de señales de células NK (144). En macrófagos, a través de su interacción con mSin3a, OGT es capaz de interferir con la activación dependiente de LPS de NFκB y la expresión de iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) (145). Además, una delección específica de OGT promovió una señalización elevada de NFκB y producción de citocinas proinflamatorias, seguido de la estimulación de varios antagonistas de TLR (Toll Like Receptor). Estos hallazgos sugieren que la O-GlcNAcilación podría desempeñar un papel anti-inflamatorio en macrófagos (146). Sin embargo, también se ha mostrado que la inhibición experimental de O-GlcNAc promueve la disminución de una respuesta inflamatoria inducida por LPS en macrófagos (147). Adicionalmente, se mostró que la O-GlcNAcilación de STAT3 en Thr717 regula de forma negativa su fosforilación y la expresión de genes dependientes de STAT3; por lo que el efecto de la O-GlcNAcilación de STAT3 podría incrementar la señalización inflamatoria (148). Debido a lo anterior, el papel de la O-GlcNAcilación en las células mieloides es complejo, ya que puede tener efectos reguladores tanto positivos como negativos en la inflamación que dependen de diversos factores como la disponibilidad de glucosa, el microambiente en el que se presente la inflamación o de la proteína modificada (NFκB o STAT) (149). También se ha mostrado que la elevación de la O-GlcNAcilación al tratar a neutrófilos con glucosamina o PUGNAc, incrementa la migración tanto basal como inducida por el péptido quimiotáctico formilado Met-Leu-Phe (fMLP) de neutrófilos. Lo anterior sugiere que los neutrófilos tienen vías de activación dependientes de O-GlcNAc, sin embargo, las proteínas exactas que son afectadas por esta modificación aún se desconocen (150). De todas las células del sistema inmune, la relación entre la O-GlcNAcilación y las células T ha sido la más estudiada y parece que juega un papel esencial en la biología de los linfocitos T. Se ha observado que la modificación por O-GlcNAc es esencial para la supervivencia de las células T ya que la delección condicional de OGT induce apoptosis masiva y disminución del número de células en el timo y en la periferia (151). También

se ha demostrado que la O-GlcNAcilación de proteínas clave en la señalización como NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cells) y de NFκB tiene efectos importantes en el comportamiento, el destino y la función de las células. La activación de TCR (T cell Receptor) induce la O-GlcNAcilación de NFATc1 en el citoplasma y promueve su translocación al núcleo. Más aún, la delección de OGT disminuye la producción de IL-2, la expresión del marcador de activación CD69 y la actividad de NFκB ya que p65 está O-GlcNAcilada (152). La O-GlcNAcilación de c-Rel promueve su unión a la región CD28R, lo cual lleva a la expresión de moléculas proinflamatorias como IL-2, INF-γ (Interferón gama) y GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulation Factor) (153). Sin embargo, también se ha demostrado que esta modificación puede proteger a las células T de la muerte celular mediante vías alternas. La O-GlcNAcilación de DFF45 (DNA Fragmentation Factor 45) confiere resistencia al corte proteolítico de caspasas durante la apoptosis inducida por daño al DNA (154). Se han identificado alrededor de 214 proteínas O-GlcNAciladas inducidas por TCR en las células T, las cuales están asociadas con el metabolismo de RNA y se ha descrito que la función de OGT es esencial para la función efectiva de las células T (155). También se ha descrito que la pérdida de la O-GlcNAcilación bloquea la capacidad de auto-renovación, la expansión clonal y la transformación maligna de las células T mientras que la O-GlcNAcilación se incrementa en las células T activadas (156). Más aún, la sobreexpresión de miR-15b bloquea la diferenciación de las células Th17 a través del bloqueo en la expresión de OGT, el bloqueo de NFκB y la expresión de ROR-γ (Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma) dependiente de NFκB (157). En comparación con las células T, el papel de O-GlcNAc en las células B se ha estudiado poco y se han hecho muchas especulaciones, pero se ha descrito que la delección de OGT en células pre-B conlleva a la expresión del receptor de células B (BCR) ineficiente, a la señalización por BAFF (B Cell Activation Factor) y al incremento en la apoptosis de células B maduras. Además, se encontró que la O-GlcNAcilación en la Ser19 de la cinasa Lyn es esencial para su interacción con la cinasa Syk en la señalización apropiada de BCR. Así mismo, la O-GlcNAcilación de las células B se requiere para el desarrollo de memoria y la producción de anticuerpos (158). De manera similar a lo observado en las células T, en células B NFκB y NFAT también están O-GlcNAcilados y esto incrementa su actividad transcripcional, por lo que se ha sugerido que la O-GlcNAcilación promueve la activación de células B (152).

**Conclusiones**

Como ya se ha mencionado anteriormente, O-GlcNAc afecta diversos procesos celulares y su papel en diversas patologías ha sido ampliamente estudiado. Mientras que se ha relacionado a O-GlcNAc con un efecto citoprotector (como en los modelos de daño al miocardio), la elevación crónica de la O-GlcNAcilación también se ha asociado con el desarrollo de hipertensión, falla cardíaca y diabetes tipo II. Los mecanismos moleculares subyacentes de la transición entre la protección y la patología aún no están bien definidos, pero se ha propuesto que una elevación aguda puede ser protectora mientras que la elevación crónica es tóxica, aunque no siempre sea el caso (159). Debido a su importancia en el mantenimiento de la homeostasis celular, la O-GlcNAcilación ya

es considerada como parte de las modificaciones postraduccionales que permiten a la célula responder propiamente a señales a través del control dinámico y directo de la función proteica (3). Asimismo, muchos autores han postulado a la O-GlcNAcilación como blanco terapéutico, incluso algunos inhibidores farmacológicos de OGA, como thiametG, han sido usados para suprimir los agregados proteicos en los modelos de patologías relacionadas a Tau; se ha observado que son bio-disponibles por vía oral y aparentemente no son tóxicos (160). Sin embargo, en cualquier caso, la regulación de la O-GlcNAcilación es un proceso mucho más complejo de lo que antes se imaginaba y muchos de los procesos en los que se involucra y su papel en los mecanismos de regulación de los procesos celulares aún dista mucho de ser haber sido descrito completamente (Figura 3).



**Figura 3. La O-GlcNAcilación influye distintos procesos celulares.** Anteriormente, la O-GlcNAcilación solo era considerada como un sensor nutricional que refleja el estado nutricional de las célula. Sin embargo, desde su descubrimiento se ha descrito su papel fundamental en diversos procesos que van desde la regulación genética en el núcleo, hasta su efecto sobre el sistema inmune. Los roles de O-GlcNAc siguen siendo descritos a través de diversas líneas de investigación para poder entender esta modificación que es la unión del estado nutricional y su regulación sobre la homeostasis celular.

## REFERENCIAS

- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O (2011) Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem* 80:825–858.
- Hart GW, Housley MP, Slawson C (2007) Cycling of O-linked- $\beta$ -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 446:1017–1022.
- Yang X, Qian K (2017) Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18:452–465.
- Ma J, Hart W, (2014) O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. *Clin Proteomics* 11:8.
- Comer FI, Hart GW (1999) O-GlcNAc and the control of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1:161–171.
- Ozcan S, Andrali SS, Cantrell JE (2010) Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochim Biophys Acta* 5-6:353–364.
- Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW (1993) RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* 268:10416–10424.
- Lewis BA, Burlingame AL, Myers SA (2016) Human RNA polymerase II promoter recruitment in vitro is regulated by OGT. *J Biol Chem* 291:14056–14061.
- Lewis BA, Hanover JA (2014) O-GlcNAc and the epigenetic regulation of gene expression. *J Biol Chem* 289:34440–34448.
- Noach N, Segev Y, Levi I, Segal S, Priel E (2007) Modification of topoisomerase I activity by glucose and by O-GlcNAcylation of the enzyme protein. *Glycobiology* 17:1357–1364.
- Chen Q, Yu X (2016) OGT restrains the expansion of DNA damage signaling. *Nucleic Acids Res* 44:9266–9278.
- Ruan HB, Han X, Li MD, Wu J, Yates II JR, Yang X (2012) O-GlcNAc transferase/host cell factor C1 complex regulates gluconeogenesis by modulating PGC-1 $\alpha$  stability. *Cell Metab* 16:226–237.
- Dentin R, Hedrick S, Xie J, Yates III J, Montminy M (2008) Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science* 319:1402–1405.
- Housley MP, Rodgers JT, Udeshi ND, Kelly TJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Puigserver P, Hart GW (2008) O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. *J Biol Chem* 283:16283–16292.
- Yang WH, Park SY, Nam HW, Kin DH, Kang JG, Kang ES, Kin YS, Lee HC, Kim KS, Cho JW (2008) NF $\kappa$ B activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17345–17350.
- Ramakrishnan P, Clark PM, Mason DE, Peters EC, Hsieh-Wilson LC Baltimore D (2013) Activation of the transcriptional function of the NF- $\kappa$ B protein c-Rel by O-GlcNAc glycosylation. *Sci Signal* 290:ra75.
- Daou S, Mashtalir N, Hammond-Martel I, Pak H, Yu H, Sui G, Vogel JL, Kristie TM, Affar EB (2011) Crosstalk between O-GlcNAcylation and proteolytic cleavage regulates the host cell factor-1 maturation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2747–2752.
- Scheuermann JC, Gaytan-de-Ayala-Alonso A, Oktaba K, Ly-Hartig N, McGinty RK, Fraterman S, Wilm M, Muir TW, Müller J (2010) Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* 465:243–247.
- Chu CS, Lo PW, Yeh YH, Hsu PH, Peng SH, Teng YC, Kang ML, Wonf CH, Juan LJ (2014) O-GlcNAcylation regulates EZH2 protein stability and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:1355–1360.
- Gambetta MC, Oktaba K, Muller J (2009) Essential role of the glycosyltransferase *sxc/Ogt* in polycomb repression. *Science* 325:93–96.
- Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder RG, Brown M, Kato S (2011) GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature* 480:557–560.
- Yang X, Zhang F, Kudlow JE (2002) Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell* 110:69–80.
- Shi FT, Kin H, Lu W, He Q, Liu D, Goodell MA, Wan M, Songyang Z (2013) Ten-eleven translocation 1 (Tet1) is regulated by O-linked N-acetylglucosamine transferase (Ogt) for target gene repression in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 288:20776–20784.
- Vella P, Scelfo A, Jammula S, Chiaccheira F, Williams K, Cuomo A, Roberto A, Christensen J, Bonaldi T, Helin K, Pasini D (2013) Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells. *Mol Cell* 49:645–656.
- Zhang Q, Liu X, Gao W, Li P, Hou J, Li J, Wong J (2014) Differential regulation of the ten-eleven

- translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked -N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J Biol Chem* 289:5986–5996.
26. Chen Q, Chen Y, Bian C, Fujiki R, Yu X (2013) TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature* 493:561–564.
  27. Nollen EAA, Morimoto RI (2002) Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci* 14:2809–2816.
  28. Morimoto RI (2012) The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 76:91–99.
  29. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development, and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:545–555.
  30. Dai C, Dai S, Cao J (2012) Proteotoxic stress of cancer: implication of the heat-shock response in oncogenesis. *J Cell Physiol* 227:2982–2987.
  31. Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW (2004) Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem* 279:30133–30142.
  32. Kazemi Z., Chang H., Haserodt S., McKen C., Zachara N.E. (2010). O-Linked -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 285, 39096–39107.
  33. Gong J, Jing L (2011) Glutamine induces heat shock protein 70 expression via O-GlcNAc modification and subsequent increased expression and transcriptional activity of heat shock factor-1. *Minerva Anestesiol* 77:488–495.
  34. Walgren JL, Vincent TS, Schey KL, Buse MG (2003) High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including beta-tubulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E424–E434.
  35. Frank LA, Sutton-McDowall ML, Brown HM, Russell DL, Gilchrist RB, Thompson JG (2014) Hyperglycaemic conditions perturb mouse oocyte in vitro developmental competence via -O-linked glycosylation of heat shock protein 90. *Hum Reprod* 29:1292–1303.
  36. Guinez C, Lemoine J, Michalski JC, Lefebvre T (2004) 70-kDa heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine. *Biochem Biophys Res Commun* 319:21–26.
  37. Zhang F, Snead CM, Catravas JD (2012) Hsp90 regulates O-linked-N-acetylglucosamine transferase: a novel mechanism of modulation of protein O-linked -N-acetylglucosamine modification in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 302: C1786–C1796.
  38. Ma Z, Vosseller K (2014) Cancer metabolism and elevated O-GlcNAc in oncogenic signaling. *J Biol Chem* 50:34457–34465.
  39. Kedersha N, Anderson P (2007) Mammalian stress granules and processing bodies. *Meth Enzymol* 431:61–81.
  40. Ohn T, Kedersha N, Hickman T, Tisdale S, Anderson P (2008) A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat Cell Biol* 10:1224–1231.
  41. McClain DA, Lubas WA, Cooksey RC, Hazel M, Parker GJ, Love DC, Handover JA (2002) Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10695–10699.
  42. Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW (2002) Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5313–5318.
  43. Arias E.B., Kim J., Cartee G.D. (2004). Prolonged incubation in PUGNAc results in increased protein O-linked glycosylation and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes* 53,921–930.
  44. Park SY, Ryu J, Lee W (2005) O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Exp Mol Med* 37:220–229.
  45. Perez-Cervera Y, Dehennaut V, Aquino-Gil M, Guedri K, Solorzano-Mata CJ, Olivier-Van Stichelen S, Foulquier F, Lefebvre T (2013) Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains. *FASEB J* 27:3478–3486.
  46. Soesanto YA, Luo B, Jones D, Taylor R, Gabrielsen JS, Parker G, McClain DA (2008) Regulation of Akt signaling by O-GlcNAc in euglycemia. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab* 295: E974–E980.
  47. Shi J, Gu J, Dai C, Gu J, Jin C, Sun J, Iqbal K, Liu F, Gong CX (2015) O-GlcNAcylation regulates ischemia-induced neuronal apoptosis through AKT signaling. *Sci Rep* 5:14500.
  48. Lehman DM, Fu DJ, Freeman AB, Hunt KJ, Leach RJ, Johnson-Pais T, Hamlington J, Dyer TD, Arya R, Abboud H, Göring HHH, Duggirala R, Blangero J, Konrad RJ, Stern MP (2005) A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective N-acetyl-β-D glucosaminidase is associated with type 2

- diabetes in Mexican Americans. *Diabetes* 54:1214–1221.
49. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 7(1):11–20
  50. Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV (2000) Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 29:21797–21800.
  51. Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua A, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, Locasale JW, Son J, Zhang H, Colloff JL, Yan H, Wang W, Chen S, Viale A, Zheng H, Paik J, Lim C, Guimaraes AR, Martin ES, Chang J, Hezel AF, Perry SR, Hu J, Gan B, Xiao Y, Asara JM, Weissleder R, Wang YA, Chin L, Cantley LC, DePinho RA (2012) Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 3:656–70.
  52. Yuneva M, Zamboni N, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y (2007) Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* 178:93–105.
  53. Wise D.R., DeBerardinis R.J., Mancuso A., Sayed N., Zhang X.Y., Pfeiffer H.K., Nissim I., Daikhin E., Yudkoff M., McMahon S.B., Thompson C.B. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 18782–18787.
  54. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB, Thompson CB (2008) Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:18782–18787.
  55. Ma Z, Vocadlo DJ, Vosseller K (2013) Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF- $\kappa$ B activity in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 21:15121–15130.
  56. Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, Vosseller K, Reginato MJ (2010) Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 29:2831–2842.
  57. Gu Y, Mi W, Ge Y, Liu H, Fan Q, Han C, Yang J, Han F, Lu X, Yu W (2010) GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res* 70:6344–6351.
  58. Lynch TP, Ferrer CM, Jackson SR, Shahriari KS, Vosseller K, Reginato MJ (2012) Critical role of O-linked -N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *J Biol Chem* 287:11070 –11081.
  59. Mi W, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, Zhang X, Cong Q, Yu W (2011) O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta* 1812:514 –519.
  60. Yehezkel G, Cohen L, Kliger A, Manor E, and Khalaila I (2012) O-linked -N-acetylglucosaminylolation (O-GlcNAcylation) in primary and metastatic colorectal cancer clones and effect of N-acetyl--D-glucosaminidase silencing on cell phenotype and transcriptome. *J Biol Chem* 287:28755–28769.
  61. Zhu Q, Zhou L, Yang Z, Lai M, Xie H, Wu L, Xing C, Zhang F, Zheng S (2012) O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Med Oncol* 29:985–993.
  62. Shi Y, Tomic, J, Wen F, Shaha S, Bahlo A, Harrison R, Dennis JW, Williams R, Gross BJ, Walker S, Zuccolo J, Deans JP, Hart GW, Spaner DE (2010) Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 24:1588–1598.
  63. Handover JA, Weiping C, Bond MR (2017) O-GlcNAc in cancer: An oncometabolism-fueled vicious cycle. *J Bioenerg Biomembr* 3:155–173.
  64. Baldini SF, Steenackers A, Olivier-Van Stichelen S, Mir AM, Mortuaire M, Lefebvre T, Guinez C (2016) Glucokinase expression is regulated by glucose through O-GlcNAc glycosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 478:942–948.
  65. Yu X, Li S (2017) Non-metabolic functions of glycolytic enzymes in tumorigenesis. *Oncogene* 36:2629–2636.
  66. Chaiyawat P, Chokchaichamnankit D, Lirdprapamongkol K, Srisomsap C, Svasti J, Champattanachai V (2015) Alteration of OGlcNAcylation affects serine phosphorylation and regulates gene expression and activity of pyruvate kinase M2 in colorectal cancer cells. *Oncol Rep* 34:1933–1942.
  67. Lynch TP, Ferrer CM, Jackson SR, Shahriari KS, Vosseller K, Reginato MJ (2012) Critical role of O-linked -N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *J Biol Chem* 287:11070 –11081.
  68. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139:871– 890.
  69. Thiery JP, Sleeman JP (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131–142.
  70. Valastyan S, Weinberg RA (2011) Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147:275–292.

71. Park SY, Kim HS, Kim NH, Ji S, Cha SY, Kang JG, Ota I, Shimada K, Konishi N, Nam HW, Hong SW, Yang WH, Roth J, Yook JI, Cho JW (2010) Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *EMBO J* 29:3787–3796.
72. Zhu W, Leber B, Andrews DW (2001) Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J* 20:5999–6007.
73. Chou TY, Hart GW, Dang CV (1995) C-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem* 32:18961–18965.
74. Itkonen HM, Minner S, Guldvik IJ, Sandmann MJ, Tsourlakis MC, Berge V, Svindland A, Schlomm T, Mills IG (2013) O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 16:5277–5287.
75. Zhang B, Zhou P, Li X, Shi Q, Li D, Ju X (2017) Bitterness in sugar: O-GlcNAcylation aggravates pre-B acute lymphocytic leukemia through glycolysis via the PI3K/Akt/c-Myc pathway. *Am J Cancer Res* 7:1337–1349.
76. Freund P, Kerenyi MA, Hager M, Wagner T, Wingelhofer B, Pham HTT, Elabd M, Han X, Valent P, Gouilleux F, Sexl V, Kramer OH, Groner B, Moriggi R (2017) O-GlcNAcylation of STAT5 controls tyrosine phosphorylation and oncogenic transcription in STAT5-dependent malignancies. *Leukemia* 31:2132–2142.
77. Allard, M. F., Schonekess, B. O., Henning, S. L., English, D. R., & Lopaschuk, G. D. (1994) Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol* 267, H742–H750.
78. Chatham, J. C., & Young, M. E. (2012). Metabolic remodeling in the hypertrophic heart: fuel for thought. *Circ Res* 111,666–668.
79. Young ME, Yan J, Razeghi P, Cooksey RC, Guthrie PH, Stepkowski SM, McClain DA, Tian R, Taegtmeyer H (2007) Proposed regulation of gene expression by glucose in rodent heart. *Gene Regul Syst Biol* 1:251–262.
80. Fulop N, Feng W, Xing D, He K, Not LG, Brocks CA, Marchase RB, Miller AP, Chatham JC (2008) Aging leads to increased levels of protein o-linked n-acetylglucosamine in heart, aorta, brain, and skeletal muscle in Brown-Norway rats. *Biogerontology* 9:139–151.
81. Facundo HT, Brainard RE, Watson LJ, Ngoh GA, Hamid T, Prabhu SD, Jones SP (2012) O-GlcNAc signaling is essential for NFAT-mediated transcriptional reprogramming during cardiomyocyte hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H2122–H2130.
82. Watson LJ, Facundo HT, Ngoh GA, Ameen M, Brainard RE, Lemma KM, Long BW, Prabhu SD, Xuan YT, Jones SP (2010) O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase is indispensable in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:17797–17802.
83. Hu Y, Suarez J, Fricovsky E, Wang H, Scott BT, Trauger SA, Han W, Hu Y, Oyeleye MO, Dillmann WH (2009) Increased enzymatic OGlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *J Biol Chem* 284:547–555.
84. Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, Trost SU, Suzuki M, Fukuda M, Dillmann WH (2003) Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. *J Biol Chem* 278:44230–44237.
85. Hu Y, Belke D, Suarez J, Swanson E, Clark R, Hoshijima M, Dillmann WH (2005) Adenovirus-mediated overexpression of O-GlcNAcase improves contractile function in the diabetic heart. *Circ Res* 96:1006–1013.
86. Ngoh GA, Facundo HT, Hamid T, Dillmann W, Zachara NE, Jones SP (2009) Unique hexosaminidase reduces metabolic survival signal and sensitizes cardiac myocytes to hypoxia/reoxygenation injury. *Circ Res* 104:41–49.
87. Mattiazii A, Kranias G (2014) The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Front Pharmacol* 27; 5:5.
88. Yokoe S, Asahi M, Takeda T, Otsu K, Taniguchi N, Miyoshi E, Suzuki K (2010) Inhibition of phospholamban phosphorylation by O-GlcNAcylation: implications for diabetic cardiomyopathy. *Glycobiology* 20:1217–1226.
89. Dassanayaka S, Jones SP (2014) O-GlcNAc and the cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics* 142:62–71.
90. Liu J, Pang Y, Chang T, Bounelis P, Chatham JC, Marchase RB (2006) Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 40:303–312.
91. Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC (2007) Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein associated O-GlcNAc. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C178–C187.
92. Fulop N, Zhang Z, Marchase RB, Chatham JC (2007) Glucosamine cardioprotection in perfused rat hearts associated with increased o-linked n-acetylglucosamine protein

- modification and altered p38 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H2227–H2236.
93. Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC (2008) Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia–reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C1509–C1520.
  94. Ngoh GA, Watson LJ, Facundo HT, Dillmann W, Jones SP (2008) Non-canonical glycosyltransferase modulates post-hypoxic cardiac myocyte death and mitochondrial permeability transition. *J Mol Cell Cardiol* 45:313–325.
  95. Jensen RV, Johnsen J, Kristiansen SB, Zachara NE, Botker HE (2013) Ischemic preconditioning increases myocardial O-GlcNAc glycosylation. *Scand Cardiovasc J* 47:168–174.
  96. Jones SP, Zachara NE, Ngoh GA, Hill BG, Teshima Y, Bhatnagar A, Hart GW, Marban E (2008) Cardioprotection by n-acetylglucosamine linkage to cellular proteins. *Circulation* 117:1172–1182.
  97. Zafir A, Readnower R, Long BW, McCracken J, Aird A, Alvarez A, Cummins TD, Li Q, Hill BG, Bhatnagar A, Prabhu SD, Bolli R, Jones SP (2013) Protein O-GlcNAcylation is a novel cytoprotective signal in cardiac stem cells. *Stem Cells* 31:765–775.
  98. Ngoh GA, Hamid T, Prabhu SD, Jones SP (2009) O-GlcNAc signaling attenuates ER stress-induced cardiomyocyte death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H1711–H1719.
  99. Hwangh, Rhim H (2018) Functional significance of O-GlcNAc neuronal modification in regulating properties. *Pharmacological Research* 129:295–307.
  100. Taylor EW, Wang K, Nelson AR, Puckett R, Bredemann TM, Fraser KB, Clinton SM, Marchase RB, Chatham JC, McMahon ALL (2014) O-GlcNAcylation of receptor GluA2 is associated depression with a novel form of long-term at hippocampal synapses. *J Neurosci.* 1:10–21.
  101. Yang YR, Song S, Hwang H, Lee JH, Jung SJ, Kim SJ, Yoon S, Hur JH, Park JI, Nam CD, Seo YK, Kim JH, Rhim H, Suh PG (2017) Memory and synaptic plasticity are impaired by dysregulated hippocampal O-GlcNAcylation. *Sci. Rep* 7:44921.
  102. Wang AC, Jensen eH, Rexach JE, Vinters HV, Hsieh-Wilson LC (2016) Loss of O-GlcNAc glycosylation in forebrain excitatory neurons induces neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 52:15120–15125.
  103. Liu Y, Li X, Yu Y, Shi J, Liang Z, Run X, Li Y, Dai CL, Grundke-Iqbal I, Iqbal KF, Liu F, Gong CX (2012) Developmental regulation of protein O-GlcNAcylation, O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase in mammalian brain. *PLoS One* 8: e43724.
  104. Lagerlof O, Hart GW, Haganir RL (2017) Excitatory O-GlcNAc transferase regulates excitatory synapse maturity. *Proc Natl Acad Sci USA* 7:1684–1689.
  105. Olivier-Van Stichelen S, Wang P, Comly M, Love DC, Hanover JA (2017) Nutrient-driven O-linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) cycling impacts neurodevelopmental timing and metabolism. *J Biol Chem* 15:6076–6085.
  106. Rexach JE, Clark PM, Mason DE, Neve RL, Peters EC, Hsieh-Wilson LC (2012) Dynamic O-GlcNAc modification regulates CREB-mediated gene expression and memory formation. *Nat Chem Biol* 3:253–261.
  107. Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM (2012) Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 7410:172–177.
  108. Ruan HB, Dietrich MO, Liu ZW, Zimmer MR, Li MD, Singh JP, Zhang K, Wu J, Horvath TL, Yang X (2014) O-GlcNAc transferase enables AgRP Neurons to suppress browning of white fat. *Cell* 2: 306–317.
  109. Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC (2004) Exploring the O-GlcNAc proteome: direct identification of O-GlcNAc-modified proteins from the brain. *Proc Nat. Acad Sci USA* 36:13132–13137.
  110. Trinidad JC, Barkan DT, Gullledge BF, Thalhammer A, Sali A, Schoepfer R, Burlingame AL (2012) Global identification and characterization of both O-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse. *Mol Cel. Proteomics* 8:215–229.
  111. Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 2:361–384.
  112. Hanger DP, Noble W (2011) Functional implications of glycogen synthase kinase-3-mediated tau phosphorylation. *Int J Alzheimers Dis* 2011:352805.
  113. Noble W, Hanger DP, Miller CC, Lovestone S (2013) The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol* 4:83.
  114. Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur EL (2008) Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 5866:1086–1089.
  115. Cho JH, Johnson GV (2003) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem* 1:187–193.

116. Sultan A, Nesslany F, Violet M, Begard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buee L, Galas MC (2011) Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem* 6:4566–4575.
117. Mondragon-Rodriguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilot A, Bourgeois C, Lauzon M, Leclerc N, Boehm J (2012) Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by tauphosphorylation, N-methyl-D-aspartate receptor-dependent. *J Biol Chem* 38:32040–32053.
118. Kimura T, Whitcomb DJ, Jo J, Regan P, Piers T, Heo S, Brown C, Hashikawa T, Murayama M, Seok M, Sotiropoulos I, Kim E, Collingridge GL, Takashima A, Cho K (2014) Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1633:20130144.
119. Lim S, Haque MM, Nam G, Ryoo N, Rhim H, Kim YK (2015) Monitoring of intracellular tau aggregation regulated by OGA/OGT inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 6 (9) (2015) 20212–20224.
120. LaFerla FM, Green KN, Oddo S (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 7:499–509.
121. Wang Y, Mandelkow E (2016) Tau in Physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci* 1: 5–21.
122. Griffith LS, Mathes M, Schmitz B (1995) Beta-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Neurosci Res* 2:270–278.
123. Jacobsen KT, Iverfeldt K (2011) O-GlcNAcylation increases non-amyloidogenic processing of the amyloid-beta precursor protein (APP). *Biochem Biophys Res Commun* 3:882–886.
124. Maries E, Dass B, Collier TJ, Kordower JH, Steece-Collier K (2003) The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nat Rev Neurosci* 9: 727–738.
125. Marotta NP, Lin YH, Lewis YE, Ambroso MR, Zaro BW, Roth MT, Arnold DB, Langen R, Pratt MR (2015) O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the protein alpha-synuclein associated with Parkinson's disease. *Nat Chem* 11:913–920.
126. Folmes CD, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A (2012) Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* 5:596–606.
127. Zhang H, Badur MG, Divakaruni AS, Parker SJ, Jager C, Hiller K, Murphy AN, Metallo CM (2016) Distinct metabolic states can support self-renewal and Lipogenesis in human pluripotent stem cells under different culture conditions. *Cell Rep* 16:1536–1547.
128. Chen CT, Shih YR, Kuo TK, Lee OK, Wei YH (2008) Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 4:960–968.
129. Turner WS, Seagle C, Galanko JA, Favorov O, Prestwich GD, Macdonald JM, Reid LM (2008) Nuclear magnetic resonance metabolomic footprinting of human hepatic stem cells and hepatoblasts cultured in hyaluronan-matrix hydrogels. *Stem Cells* 6:1547–1555.
130. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, Schneider JW, Zang CC, Sadek H (2010) The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 3:380–390.
131. Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A (2010) Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 2:150–161.
132. Varum S, Momcilovic O, Castro C, Ben-Yehudah A, Ramalho-Santos J, Navara CS (2009) Enhancement of human embryonic stem cell pluripotency through inhibition of the mitochondrial respiratory chain. *Stem Cell Res* 2–3:142–156
133. Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, Smuga-Otto K, Howden SE, Diol NR, Popson NE, Wagner R, Lee GO, Antonsiewics-Bourget J, Teng JMC, Thomson JA (2011) Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods* 5:424–429.
134. Kondoh H, Lleonart ME, Nakashima Y, Yokode M, Tanaka M, Bernard D, Gil J, Beach D (2007) A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxid Redox Signal* 3:293–299.
135. Marsboom G, Zhang GF, Pohl-Avila N, Zhang Y, Yuan Y, Kang H, Hao B, Brunengraber H, Malik AB, Rehman J (2016) Glutamine metabolism regulates the pluripotency transcription factor OCT4. *Cell Rep* 2:323–332.
136. Sharma NS, Saluja AK, Banerjee S (2018) Nutrient-sensing and self-renewal: O-GlcNAc in a new role. *J Bioenerg Biomembr* 50: 205–211.
137. Shafi R, Iyer SPN, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW, Marth JD (2000) The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *PNAS* 11:5735–5739.
138. Jang H, Kim TW, Yoon S, Choi SY, Kang TW, Kim SY, Kwon YW, Cho EJ, Youn HD (2012) O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by

- directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell* 11:62–74.
139. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–76.
  140. Speakman CM, Domke TC, Wongpaiboonwattana W, Sanders K, Mudaliar M, van Aalten DM, Barton GJ, Stavridis MP (2014) Elevated O-GlcNAc levels activate epigenetically repressed genes and delay mouse ESC differentiation without affecting naive to primed cell transition. *Stem Cells* 32(10):2605–2615.
  141. Pathak S, Borodkin VS, Albarbarawi O, Campbell DG, Ibrahim A, van Aalten DM (2012) O-GlcNAcylation of TAB1 modulates TAK1-mediated cytokine release. *EMBO J* 31:1394–1404.
  142. Chikanishi T, Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Kato S (2010) Glucose induced expression of MIP-1 genes requires O-GlcNAc transferase in monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 394:865–870.
  143. Dias WB, Cheung WD, Wang Z, Hart GW (2009) Regulation of calcium/calmodulin dependent kinase IV by O-GlcNAc modification. *J Biol Chem* 284:21327–21337.
  144. Yao AY, Tang HY, Wang Y, Feng MF, Zhou RL (2004) Inhibition of the activating signals in NK92 cells by recombinant GST-sHLA-G1a chain. *Cell Res* 14:155–160.
  145. Hwang SY, Hwang JS, Kim SY, Han IO (2013) O-GlcNAc transferase inhibits LPS-mediated expression of inducible nitric oxide synthase through an increased interaction with mSin3A in RAW264.7 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 305:C601–C608.
  146. Li X, Gong W, Li L, Wen H (2017) Downregulation of the O-GlcNAc signaling promotes activation of the innate immune response in microbial sepsis. *J Immunol* 70:78.
  147. Ryu IH, Do SI (2011) Denitrosylation of S-nitrosylated OGT is triggered in LPS-stimulated innate immune response. *Biochem Biophys Res Commun* 408:52–57.
  148. Li X, Zhang Z, Li L, Gong W, Lazenby AJ, Swanson BJ, Herring LE, Asara JM, Singer JD, Wen H (2017) Myeloid-derived cullin 3 promotes STAT3 phosphorylation by inhibiting OGT expression and protects against intestinal inflammation. *J Exp Med* 214:1093–1109.
  149. de Jesus T, Shukla S, Ramakrishnan P (2018) Too sweet to resist: Control of immune cell function by O-GlcNAcylation. *Cellular Immunology* 333:85–92.
  150. Kneass ZT, Marchase RB (2005) Protein O-GlcNAc modulates motility-associated signaling intermediates in neutrophils. *J Biol Chem* 280:14579–14585.
  151. O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW, Marth JD (2004) Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol* 24:1680–1690.
  152. Golks A, Tran TT, Goetschy JF, Guerin D (2007) Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. *EMBO J* 26:4368–4379.
  153. Ramakrishnan P, Clark PM, Mason DE, Peters EC, Hsieh-Wilson LC, Baltimore D (2013) Activation of the transcriptional function of the NF-kappaB protein c-Rel by O-GlcNAc glycosylation. *Sci Signal* 6:ra75.
  154. Johnson B, Opimba M, Bernier J (2014) Implications of the O-GlcNAc modification in the regulation of nuclear apoptosis in T cells. *Biochim Biophys Acta* 1840:191–198.
  155. Lund PJ, Elias JE, Davis MM (2016) Global analysis of O-GlcNAc glycoproteins in activated human T cells. *J Immunol* 197:3086–3098.
  156. Swamy M, Pathak S, Grzes KM, Damerow S, Sinclair LV, van Aalten DM, Cantrell DA (2016) Glucose and glutamine fuel protein O-GlcNAcylation to control T cell self-renewal and malignancy. *Nat Immunol* 17:712–720.
  157. Liu R, Ma X, Chen L, Yang Y, Zeng Y, Gao J, Jiang W, Zhang F, Li D, Han B, Han R, Qiu R, Huang W, Wang Y, Hao J (2017) MicroRNA-15b suppresses Th17 differentiation and is associated with pathogenesis of multiple sclerosis by targeting O-GlcNAc transferase. *J Immunol* 198:2626–2639.
  158. Wu JL, Chiang MF, Hsu PH, Tsai DY, Hung KH, Wang YH, Angata T, Lin KI (2017) O-GlcNAcylation is required for B cell homeostasis and antibody responses. *Nat Commun* 8:1854.
  159. Martinez MR, Dias TB, Natov PS, Zachara NE (2017) Stress-induced O-GlcNAcylation: an adaptive process of injured cells. *Biochemical Society Transactions* 45:237–249
  160. Yuzwa SA, Shan X, Macauley MS, Clark T, Skorobogatko Y, Vosseller K, Vocadlo DJ (2012) Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat Chem Biol* 8:393–399.

## **11. ARTÍCULOS ADICIONALES PUBLICADOS DURANTE LOS ESTUDIOS DE POSGRADO**

- Izquierdo-Torres E, Hernández-Oliveras A, Fuentes-García G, Zarain-Herzberg Á. Calcium signaling and epigenetics: A key point to understand carcinogenesis. *Cell Calcium* 2020 (91): 102285.
- Flores-Hernández E, Velázquez DM, Castañeda-Patlan C, Fuentes-García G, Fonseca-Camarillo, Yamamoto-Furusho JK, Romero-Avila M, García-Sainz JA, Robles-Flores M. Canonical and non-canonical Wnt signaling are simultaneously activated by Wnts in colon cancer cells. *Cellular Signaling* 2020 (72): 109636.
- Izquierdo-Torres E, Hernández-Oliveras A, Meneses-Morales I, Rodríguez G, Fuentes-García G, Zarain-Herzberg Á. Resveratrol up-regulates ATP2A3 gene expression in breast cancer cell lines through epigenetic mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019(113):37-47.
- Castañeda-Patlán C, Fuentes-García G and Robles-Flores M. Wnt Signaling as a Master Regulator of Immune Tolerance in a Tumor Microenvironment. Chapter at *Cell Signaling Book*. Open Access: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81619>

## 12. REFERENCIAS

Alisson-Silva F, Freire-de-Lima L, Donadio JL, Lucena MC, Penha L, Sa-Diniz JN, Dias WB, Todeschini AR. (2013). Increase of O-glycosylated oncofetal fibronectin in high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of cultured human epithelial cells. *PLoS One* 8:e60471.

Allison, DF, Wamsley JJ, Kumar M, Li Duo, Gray LG, Hart GW, Jones DR and Mayo MW. (2012). Modification of RelA by O-linked N-acetylglucosamine links glucose metabolism to NF- $\kappa$ B acetylation and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 16888–16893.

Altman BJ, Stine ZE and Dang CV. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 16:619-634.

Angelastro JM, Lame M. (2010). Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells. *Mol Cancer Res* 8:1105–15.

Bánky B, Rásó-Barnett L, Barbai T, Tímár J, Becságh P, Rásó E. (2012). Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression. *Mol Cancer* 11:83.

Bautista SJ, Boras I, Vissa A, Mecica N, Yip CM, Kim PK and Antonescu CN. (2018). mTOR complex 1 controls the nuclear localization and function of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *J Biol Chem* 293(38):14723–39.

Bellizzi A, Sebastian S, Ceglia P, Centonze M, Divella R, Manzillo EF, Azzariti A, Silvestris N, Montemurro S, Caliendo C, De Luca R, Cicero G, Rizzo S, Russo A, Quaranta M, Simone G and Paradiso A. (2013). Co-expression of CD133 (+)/CD44(+) in human colon cancer and liver metastasis. *J Cell Physiol.* (2013) 228:408–15.

Brady CA and Attardi LD. (2010). p53 at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 2527–2532.

Cadigan KM and Peifer M. (2009). Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. (Abstract) *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a002881.

Cairns RA and Mak TW. (2016). The current state of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer* 16: 13-614.

Cairns RA, Harris IS and Mak TW. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11: 85-95.

Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, Vosseller K, Reginato MJ. (2010). Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 29:2831–2842.

Chaiyawat P, Chokchaichamnankit D, Lirdprapamongkol K, Srisomsap C, Svasti J, Champattanachai V (2015) Alteration of O-GlcNAcylation affects serine phosphorylation and regulates gene expression and activity of pyruvate kinase M2 in colorectal cancer. *ONCOLOGY REPORTS* 34: 1933-1942.

Chatham JC and Marchase RB. (2010). Protein O-GlcNAcylation: A critical regulator of the cellular response to stress. *Curr Signal Transduct Ther* 5(1):49-59

Chen CT, Shih YR, Kuo TK, Lee OK, Wei YH. (2008). Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 4:960–968.

Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, Smuga-Otto K, Howden SE, Diol NR, Popson NE, Wagner R, Lee GO, Antonsiewics-Bourget J, Teng JMC, Thomson JA. (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods* 5:424–429.

Chen KL, Pan F, Jiang H, Chen JF, Pei L, Xie FW and Liang HJ. (2011b). Highly enriched CD133(+)CD44(+) stem-like cells with CD133(+)CD44(high) metastatic subset in HCT116 colon cancer cells. *Clin Exp Metast* 28:751–63.

Chen Q and Yu X. (2016). OGT restrains the expansion of DNA damage signaling. *Nucleic Acids Res* 44:9266–9278.

Chokchaitaweek C, Kobayashi T, Izumikawa T, Itano N. (2019). Enhanced hexosamine metabolism drives metabolic and signaling networks involving hyaluronan production and O-GlcNAcylation to exacerbate breast cancer. *Cell Death Dis* 10:803.

Chou TY, Hart GW, Dang CV. (1995). c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem* 270:18961–18965

Chou TY, Hart GW. (2001). O-linked N-acetylglucosamine and cancer: messages from the glycosylation of c-Myc. *Adv Exp Med Biol* 491: 413–418.

Comer FI and Hart GW (1999) O-GlcNAc and the control of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1:161–171.

Dai C and Gu W. (2010). p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol. Med.* 16, 528–536

Daou S, Mashtalir N, Hammond-Martel I, Pak H, Yu H, Sui G, Vogel JL, Kristie TM, Affar EB. (2011). Crosstalk between O-GlcNAcylation and proteolytic cleavage regulates the host cell factor-1 maturation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2747–2752.

DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7(1):11–20.

Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky A, Souza AL, Triantafellow EI, Ma Q, Gorski T, Cleaver S, Vancer Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LP and Manning BD. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* 39, 171–183.

Esteller M, Avizienyte E, Corn P, Lothe R, Baylin S, Aaltonen L, Herman J. (2000). Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz–Jeghers syndrome. *Oncogene* 19, 164–168.

Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issad T. (2013). O-GlcNAcylation: a new cancer hallmark. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:99.

Ferrer CM, Lu TY, Bacigalupa ZA, Katsetos CD, Sinclair DA, Reginato MJ. (2017). O-GlcNAcylation regulates breast cancer metastasis via SIRT1 modulation of FOXM1 pathway. *Oncogene* 36:559–569.

Ferrer CM, Lynch TP, Sodi VL, Falcone JN, Schwab LP, Peacock DL, Vocadlo DJ, Seagroves TN, Reginato MJ. (2014). O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway. *Mol Cell* 54:820–831.

Folmes CD, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A. (2012). Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* 5:596-606.

Fouad YA and Aanei C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* 7(5):1016-1036

Fuentes-García G, Patlán-Castañeda C, Lefebvre T and Robles-Flores M. (2021). La función de la O-β-N-Acetilglucosamina (O-GlcNAc) en los procesos de enfermedad. *REB* 40(3):128-144.

Gao Z, Cox JL, Gilmore JM, Ormsbee BD, Mallanna SK, Washburn MP and Rizzino A. (2012). Determination of protein interactome of transcription factor Sox2 in embryonic stem cells engineered for inducible expression of four reprogramming factors. *J Biol Chem* 287(14):11384–11397.

García J, Silva J, Peña C, Garcia V, Rodriguez R, Cruz MA, Cnatos B, Provencio M, Expaña P and Bolinlla F. (2004). Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* 41, 117–124

Gloster TM, Zandberg WF, Heinonen JE, Shen DL, Deng L, Vocadlo DJ. (2011). Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nat Chem Biol* 7:174–181.

Gregory MA, Qi Y and Hann SR. (2003). Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-Myc proteolysis and subnuclear localization. *J. Biol. Chem.* 278, 51606–51612.

Gu Y, Mi W, Ge Y, Liu H, Fan Q, Han C, Yang J, Han F, Lu X, Yu W. (2010). GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res* 70:6344-6351.

Guo H, Zhang B, Nairn AV, Nagy T, Moremen KW, Buckhaults P and Pierce M. (2017). O-linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) expression levels epigenetically regulate colon cancer tumorigenesis by affecting the cancer stem cell compartment via modulating expression of transcriptional factor MYBL1. *J Biol Chem* 292(10):4123–4137.

Hanahan D and Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: Next generation. *Cell* 144, 4: 646-674

Hanover JA, Chen W, Bond MR. (2018). O-GlcNAc in cancer: An Oncometabolism-fueled vicious cycle. *J Bioenerg Biomembr Jun*;50(3):155-173.

Haraguchi N, Ohkuma M, Sakashita H, Matsuzaki S, Tanaka F, Mimori K, Kamohara Y, Inoue H and Mori M. (2008). CD133+CD44+ Population Efficiently Enriches Colon Cancer Initiating Cells. *Ann Surg Oncol* 15, 2927–2933.

Hardee ME, Dewhirst MW, Agarwal N, and Sorg BS. (2009). Novel imaging provides new insights into mechanisms of oxygen transport in tumors. *Curr Mol Med* 9, 435–441.

Hart GW, Housley MP, Slawson C (2007) Cycling of O-linked- $\beta$ -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 446:1017-1022.

Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G and Lagerlof O. (2011). Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 825–858.

Hay N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 16: 635-649.

Heberle AM, Prentzell MT, Van Eunen K, Bakker BM, Greltscheld S and Thedieck K. (2015). Molecular mechanisms of mTOR regulation by stress. *Mol Cell Oncol* 2(2): e970489.

Hou Y, Zou Q, Ge R, Shen F, Wang Y. (2012). The critical role of CD133(+)/CD44 (+/high) tumor cells in hematogenous metastasis of liver cancers. *Cell Res* 22:259–72.

Housley MP, Rodgers JT, Udeshi ND, Kelly TJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Puigserver P, Hart GW. (2008). O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. *J Biol Chem* 283(24):16283–16292.

Huang X, Sheng Y, Guan M. (2012). Co-expression of stem cell genes CD133 and CD44 in colorectal cancers with early liver metastasis. *Surg Oncol* 21:103–7.

Itkonen HM, Engedal N, Babaie E, Luhr M, Guldvik IJ, Minner S, Hohloch J, Tsourlakis MC, Schlomm T and Mills IG. (2015). UAP1 is overexpressed in prostate cancer and is protective against inhibitors of N-linked glycosylation. *Oncogene* 34:3744–5032.

Itkonen HM, Gorad SS, Dubeau DY, Martin SES, Barkovskaya A, Bathen TF, Moestue SA and Mills IG. (2016). Inhibition of O-GlcNAc transferase activity reprograms prostate cancer cell metabolism. *Oncotarget*. 7:12464–76.

Itkonen HM, Minner S, Guldvik IJ, Sandmann MJ, Tsourlakis MC, Berge V, Svindland A, Schlomm T and Mills IG. (2013). O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 73(16):5277–5287.

Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, Nomiyama K, Hosokawa K, Sakurada K, Nakagata N, Ikeda Y, Mak TW and Suda T. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431(7011):997–1002.

Jang H, Kim TW, Yoon S, Choi SY, Kang TW, Kim SY, Kwon YW, Cho EJ, Youn HD. (2012). O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell* 11:62–74.

Jang TJ. (2016). Differential membranous E-cadherin expression, cell proliferation and O-GlcNAcylation between primary and metastatic nodal lesion in colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 212:113–119.

Jeon JH, Suh HN, Kim MO, Ryu JM, Han HJ. (2014). Glucosamine induced OGT activation mediates glucose production through cleaved Notch1 and FoxO1, which coordinately contributed to the regulation of maintenance of self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 23(17):2067–2079.

Jones RG and Thompson CB. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23, 537–548.

Kang ES, Han D, Park J, Kwak TK, Oh MA, Lee SA, Choi S, Park ZY, Kim Y, Lee JW. (2008). O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic beta cells. *Exp Cell Res* 314:2238–2248.

Kazemi Z, Chang H, Haserodt S, McKen C, Zachara NE. (2010). O-linked beta-Nacetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3beta-dependent manner. *J Biol Chem*. 285 (50):39096-107.

Kim ST, Sohn I, Do I-G, Jang J, Kim SH, Jung SH, Park JO, Park YS, Talasaz A, Lee J and Kim HC. (2014). Transcriptome analysis of CD133-positive stem cells and prognostic value of survivin in colorectal cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 11:259–66.

Kobayashi CI and Suda T. (2012). Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells. *J Cell Physiol* 227(2):421–430.

Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima N, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JPJ and Sekido Y. (2007). Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatology Res* 37:974-983.

Krześlak A, Józwiak P, Lipińska A. (2011). Down-regulation of  $\beta$ -Nacetyl-D-glucosaminidase increases Akt1 activity in thyroid anaplastic cancer cells. *Oncol Rep* 26:743–749.

Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, Christeff N, Issad T. (2008). O-GlcNAc modification of FoxO1 increases its transcriptional activity: a role in the glucotoxicity phenomenon? *Biochimie* 90(5):679–685.

Lai YS, Chang CW, Pawlik KM, Zhou D, Renfrow MB, Townes TM. (2012). SRY (sex determining region Y)-box2 (Sox2)/poly ADPribose polymerase 1 (Parp1) complexes regulate pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(10):3772–3777.

Lazarus BD, Love DC, Hanover JA. (2006). Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. *Glycobiology* 16: 415–421.

Li Y, Wang L, Liu J, Zhang P, An M, Han C Li X and Zhang K. (2017). O-GlcNAcylation modulates Bmi-1 protein stability and potential oncogenic function in prostate cancer. *Oncogene*.

Li Z. (2013). CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hematol Oncol* 2:17.

Liu J, Pang Y, Chang T, Bounelis P, Chatham JC, Marchase RB. (2006). Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia. *J. Mol. Cell Cardiol* 40:303–12.

Lucena MC, Carvalho-Cruz P, Donadio JL, Oliveira IA, de Queiroz RM, Marinho-Carvalho MM, Sola-Penna M, de Paula IF, Gondim KC, McComb ME, Costello CE, Whelan SA, Todeschini AR, Dias WB. (2016). Epithelial Mesenchymal Transition Induces Aberrant Glycosylation through Hexosamine Biosynthetic Pathway Activation. *J Biol Chem* 17; 291(25): 12917-29.

Lv L, Liu H-G, Dong SY, Yang F, Wang Q-X, Guo G-L, Pan Y-F and Zhang X-H. (2015). Upregulation of CD44v6 contributes to acquired chemoresistance via the modulation of autophagy in colon cancer SW480 cells. *Tumor Biol* 37:8811–24.

Lynch TP, Ferrer CM, Jackson SR, Shahriari KS, Vosseller K, Reginato MJ. (2012). Critical role of O-linked -N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *J Biol Chem* 287:11070 –11081.

Ma J and Hart W. (2014). O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. *Clin Proteomics* 11:8.

Ma Z and Vosseller K. (2014). Cancer metabolism and elevated O-GlcNAc in oncogenic signaling. *J Biol Chem* 12;289(50):34457-65.

Ma Z, Vocadlo DJ, Vosseller K. (2013). Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF- $\kappa$ B activity in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 21:15121-15130.

Marsboom G, Zhang GF, Pohl-Avila N, Zhang Y, Yuan Y, Kang H, Hao B, Brunengraber H, Malik AB, Rehman J. (2016). Glutamine metabolism regulates the pluripotency transcription factor OCT4. *Cell Rep* 2:323–332.

Matthews JA, Acevedo-Duncan M, Potter RL. (2005). Selective decrease of membrane associated PKC- $\alpha$  and PKC- $\epsilon$  in response to elevated intracellular O-GlcNAc levels in transformed human glial cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1743:305–315.

Mattiuzzi C and Lippi G. (2019). Current Cancer Epidemiology. *Journal of Epidemiology and Global Health* 9(4) 217–222.

McGinn O, Gupta VK, Dauer P, Arora N, Sharma N, Nomura A, Dudeja V, Saluja A and Banerjee S. (2017). Inhibition of hypoxic response decreases stemness and reduces tumorigenic signaling due to impaired assembly of HIF1 transcription complex in pancreatic cancer. *Sci Rep* 7(1):7872.

Meng D, Frank AR, Jewell JL. (2018). mTOR signaling in stem and progenitor cells. *Development* 145:dev152595.

Mi W, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, Zhang X, Cong Q, Yu W. (2011). O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta* 1812:514–519.

Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 2:150–161.

Myers SA, Peddada S, Chatterjee N, Friedrich T, Tomoda K, Krings G, Thomas S, Maynard J, Broeker M, Thomson M, Pollard K, Yamanaka S, Burlingame AL and Panning B. (2016). SOX2 O-GlcNAcylation alters its protein-protein interactions and genomic occupancy to modulate gene expression in pluripotent cells. *elife* 5:e10647.

Noach N, Segev Y, Levi I, Segal S, Priel E. (2007). Modification of topoisomerase I activity by glucose and by O-GlcNAcylation of the enzyme protein. *Glycobiology* 17:1357–1364.

Novikova DS, Garabadzhiu AV, Melino G, Barlev NA, Tribulovich VG. (2015). AMP activated protein kinase: structure, function, and role in pathological processes. *Biochem (Mosc)* 80(2):127–44.

Olivier-Van Stichelen S and Hanover JA. (2015). You are what you eat: O-linked N-acetylglucosamine in disease, development and epigenetics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 18:339–345.

Olivier-Van Stichelen S, Dehennaut V, Buzy A, Zachayus JL, Guinez C, Mir AM, El Yazidi-Belkoura I, Copin MC, Boureme D, Loyaux D, Ferrara P, Lefebvre T. (2014). O-GlcNAcylation stabilizes b-catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB J* 28:3325–3338.

Olivier-Van Stichelen S, Guinez C, Mir AM, Perez-Cervera Y, Liu C, Michalski JC, Lefebvre T. (2012). The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of b-catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E417–E424.

Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 29:21797-21800.

Ozcan S, Andrali SS, Cantrell JE. (2010). Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochim Biophys Acta* 5-6:353–364.

Pardo M, Lang B, Yu L, Prosser H, Bradley A, Babu MM and Choudhary J. (2010). An expanded Oct4 interaction network: implications for stem cell biology, development, and disease. *Cell Stem Cell* 6:382–95.

Park SY, Kim HS, Kim NH, Ji S, Cha SY, Kang JG, Ota I, Shimada K, Konishi N, Nam HW, Hong SW, Yang WH, Roth J, Yook JI, Cho JW. (2010). Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *EMBO J* 29:3787–3796.

Pavlova NN and Thompson CB. (2016). The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab* 3:27-47.

Phoomak C, Vaeteewoottacharn K, Silsirivanit A, Saengboonmee C, Seubwai W, Sawanyawisuth K, Wongkham C, Wongkham S. (2017). High glucose levels boost the aggressiveness of highly metastatic cholangiocarcinoma cells via O-GlcNAcylation. *Sci Rep* 7:43842.

Place T, Fitzgerald M, Venkataraman S, Vorrink S, Case A, Teoh M, Domann F. (2011). Aberrant promoter CpG methylation is a mechanism for impaired PHD3 expression in a diverse set of malignant cells. *PLoS ONE* 6, 14617.

Renault VM, Rafalski VA, Morgan AA, Salih DA, Brett JO, Webb AE, Villeda SA, Thekkat PU, Guillerey C, Denko NC, Palmer TD, Butte AJ and Brunet. (2009). FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell* 5(5):527–539.

Robles-Flores M, Meléndez L, García W, Mendoza-Hernández G, Lam TT, Castañeda-Patlán C, González-Aguilar H. (2008). Posttranslational modifications on protein kinase C isozymes. Effects of Epinephrine and phorbol esters. *BBA Mol Cell Res* 1783: 695-712.

Robles-Flores M. Moreno-Londoño AP and Castañeda Patlán MC. (2021). Signaling Pathways Involved in Nutrient Sensing Control in Cancer Stem Cells: An Overview. *Front Endocrinol (Lausanne)* 22;12:627745.

Röhrig F and Schulze A. (2016). The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer* 16:732-749.

Rozanski W, Krzeslak A, Forma E, Brys M, Blewniewski M, Wozniak P and Lipinski M. (2012). Prediction of bladder cancer based on urinary content of MGEA5 and OGT mRNA level. *Clin Lab* 58:579–83.

Ruan HB, Singh JP, Li MD, Wu J and Yang X. (2013). Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 24, 301–309.

Sancho P, Barneda D, Heeschen C. (2016). Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer* 114:1305–12

Santoyo-Ramos P, Castañeda-Patlán C, Robles-Flores M. (2014). The Role of O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Modification in Cell Signaling. *10.5772/47874*.

Sayat R, Leber B, Grubac V, Wiltshire L, Persad S. (2008). O-GlcNAc-glycosylation of  $\beta$ -catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp Cell Res* 314: 2774-2787.

Semenza, G.L. (2008). Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J. Clin. Invest.* 118, 3835–3837.

Semenza, G.L. (2010a). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 51–56.

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

Shafi R, Iyer S P, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW and Marth JD. (2000). The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 5735–5739.

Sharma NS, Saluja AK, Banerjee S. (2018). Nutrient-sensing and self-renewal: O-GlcNAc in a new role. *J Bioenerg Biomembr* 50: 205–211.

Shi C, Tian R, Wang M, Wang X, Jiang J, Zhang Z, Li X, He Z, Gong W and Qin R. (2010b). CD44+ CD133+ population exhibits cancer stem cell-like characteristics in human gallbladder carcinoma. *Cancer Biol Ther* 10:1182–90.

Shi Y, Tomic, J, Wen F, Shaha S, Bahlo A, Harrison R, Dennis JW, Williams R, Gross BJ, Walker S, Zuccolo J, Deans JP, Hart GW, Spaner DE. (2010). Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 24:1588-1598.

Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, Schneider JW, Zang CC, Sadek H. (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 3:380–390.

Singh JP, Zhang K, Wu J and Yang X. (2015). O-GlcNAc signaling in cancer metabolism and epigenetics. *Cancer Letters* 356:244–250.

Slawson C and Hart GW. (2011). O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology. *Nat Rev Cancer* 18;11(9):678-84.

Speakman CM, Domke TC, Wongpaiboonwattana W, Sanders K, Mudaliar M, van Aalten DM, Barton GJ and Stavridis MP. (2014). Elevated O-GlcNAc levels activate epigenetically repressed genes and delay mouse ESC differentiation without affecting naive to primed cell transition. *Stem Cells* 32(10):2605–2615.

Steenackers A, Olivier-Van Stichelen S, Baldini SF, Dehennaut V, Toillon RA, Le Bourhis X, El Yazidi-Belkoura I, Lefebvre T. (2016). Silencing the nucleocytoplasmic

O-GlcNAc transferase reduces proliferation, adhesion, and migration of cancer and fetal human colon cell lines. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7:46.

Szablewski L. (2013). Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim Biophys Acta* 1835: 164.

Takahashi K and Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-76.  
Tan EP, Duncan FE, Slawson C. (2017). The sweet side of the cell cycle. *Biochem Soc Trans* 45:313–322.

Taniguchi H, Moriya C, Igarashi H, Saito A, Yamamoto H, Adachi Y and Imai K. (2016). Cancer stem cells in human gastrointestinal cancer. *Cancer Sci* 107:1556–62.

Taparra K, Tran PT, Zachara NE. (2016). Hijacking the hexosamine biosynthetic pathway to promote EMT-mediated neoplastic phenotypes. *Front Oncol* 6:85.

Torrence ME, Manning BD. (2018). Nutrient Sensing in Cancer. *Annu Rev Cancer Biol* 2(1):251–69.

Turner WS, Seagle C, Galanko JA, Favorov O, Prestwich GD, Macdonald JM, Reid LM. (2008). Nuclear magnetic resonance metabolomic footprinting of human hepatic stem cells and hepatoblasts cultured in hyaluronan-matrix hydrogels. *Stem Cells* 6:1547–1555.

Valero V, Pawlik TM, Anders RA. (2015). Emerging role of Hpo signaling and YAP in hepatocellular carcinoma. *J Hepatocell Carcinoma* 2:69–78.

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

Vanharanta S, Shu W, Brenet F, Hakimi AA, Heguy A, Biale A, Reuter VE, Hsieh JJD, Scandura JM and Massagué J. (2012). Epigenetic expansion of VHL-HIF signal output drives multiorgan metastasis in renal cancer. *Nat Med* 19, 50–56  
Varum S, Momcilovic O, Castro C, Ben-Yehudah A, Ramalho-Santos J, Navara CS. (2009). Enhancement of human embryonic stem cell pluripotency through inhibition of the mitochondrial respiratory chain. *Stem Cell Res* 2–3:142–156.

Wang K, Xu J, Zhang J, Huang J. (2012). Prognostic role of CD133 expression in colorectal cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer* 12: 573.

Warburg O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123:309–14.

Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB, Thompson CB. (2008). Myc regulates a

transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:18782–18787.

Yanes O, Clark J, Wong DM, Patti GJ, Sanchez-Ruiz A, Benton HP, Trauger SA, Desponts C, Ding S and Siuzdak G. (2010). Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat Chem Biol* 6(6):411–417.

Yang X and Qian K. (2017). Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18:452–465

Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ, Evans RM. (2008). Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 451:964–969.

Yang Y, Yin X, Yang H, Xu Y. (2015). Histone demethylase LSD2 acts as an E3 ubiquitin ligase and inhibits cancer cell growth through promoting proteasomal degradation of OGT. *Mol Cell* 58:47–59.

Yehezkel G, Cohen L, Kliger A, Manor E, and Khalaila I. (2012). O-linked -N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) in primary and metastatic colorectal cancer clones and effect of N-acetyl-D-glucosaminidase silencing on cell phenotype and transcriptome. *J Biol Chem* 287:28755–28769.

Yilmaz M and Christofori G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28:15–33.

Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua A, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, Locasale JW, Son J, Zhang H, Coloff JL, Yan H, Wang W, Chen S, Viale A, Zheng H, Paik J, Lim C, Guimaraes AR, Martin ES, Chang J, Hezel AF, Perry SR, Hu J, Gan B, Xiao Y, Asara JM, Weissleder R, Wang YA, Chin L, Cantley LC, DePinho RA. (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 3:656-70.

Yu X and Li S. (2017) Non-metabolic functions of glycolytic enzymes in tumorigenesis. *Oncogene* 36:2629–2636.

Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW. (2004). Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem* 279:30133–42.

Zafir A, Readnower R, Long BW, McCracken J, Aird A, Alvarez A, Cummins TD, Li Q, Hill BG, Bhatnagar A, Prabhu SD, Bolli R and Jones SP. (2013). Protein O-GlcNAcylation is a novel cytoprotective signal in cardiac stem cells. *Stem cells* 31(4), 765–775.

Zeng Q, Zhao RX, Chen J, Li Y, Li XD, Liu XL, Zhang WM, Quan CS, Wang YS, Zhai YX, Wang JW, Youssef M, Cui R, Liang J, Genovese N, Chow LT, Li YL, Xu

ZX. (2016). O-linked GlcNAcylation elevated by HPV E6 mediates viral oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:9333–9338.

Zhang C, Guan Y, Sun Y, Ai D and Guo Q. (2016). Tumor heterogeneity and circulating tumor cells. *Cancer Lett* 374:216-223.

Zhang Q, Liu X, Gao W, Li P, Hou J, Li J and Wong. (2014). Differential regulation of the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J Biol Chem* 289, 5986–5996.

Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. (2010). A subpopulation of CD133 (+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett* 289:151–60.

Zhang X, Qiao Y, Wu Q, Chen Y, Zou S, Liu X, Zhu G, Zhao Y, Chen Y, Yu Y, Pan Q, Wang J, Sun. (2017). The essential role of YAP O-GlcNAcylation in high-glucose-stimulated liver tumorigenesis. *Nat Commun* 8:15280.

Zhang X, Yalcin S, Lee DF, Yeh TY, Lee SM, Su J, Mungamuri SK, Rimmele P, Kennedy M, Sellers R, Landhaler M, Tuschl T, Chi NW, Keller G and Ghaffari S. (2011). FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 13(9):1092–1099.

Zhang Y and Reinberg D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails, *Genes Dev.* 15: 2343–2360.

Zhao Y, Peng J, Zhang E, Jiang N, Li J, Zhang Q, Zhang X, Niu Y. (2016). CD133 expression may be useful as a prognostic indicator in colorectal cancer, a tool for optimizing therapy and supportive evidence for the cancer stem cell hypothesis: a meta-analysis. *Oncotarget* 7: 10023–36.

Zhu G, Tao T, Zhang D, Liu X, Qiu H, Han L, Xu Z, Xiao Y, Cheng C, Shen A. (2016). O-GlcNAcylation of histone deacetylases 1 in hepatocellular carcinoma promotes cancer progression. *Glycobiology* 26:820–833.

Zhu Q, Zhou L, Yang Z, Lai M, Xie H, Wu L, Xing C, Zhang F, Zheng S. (2012). O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Med Oncol* 29:985–993.

Zhu W, Leber B, Andrews DW. (2001). Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J* 20:5999–6007.

Zoller M. (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer* 11(4):254–67.