

Estudi de l'activació de la glucocinasa (GK_{A456V}) en fetge perivenós

Anna Vidal Alabró

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Programa de Doctorat de BIOMEDICINA
Bienni 2002-2004

Estudi de l'activació de la glucocinasa (GK_{A456V}) en fetge perivenós

**Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció
del Dr. Jose Carlos Perales Losa a la Unitat de
Biofísica del Departament de Ciències
Fisiològiques II de la Universitat de Barcelona**

Anna Vidal Alabró

Jose Carlos Perales Losa

Memòria presentada per Anna Vidal Alabró
per optar a grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

L'Hospitalet de Llobregat, febrer de 2011

*La cosa més incomprensible del món
és que sigui comprensible.*

Albert Einstein

A en Joan.
I els nostres fills,
Martina, Jan i Queralt.

Als meus pares.

AGRAÏMENTS

Ara em toca a mi... Després d'haver vist tants companys i amics en aquest punt, ara m'arriba l'hora d'escriure els agraïments, que és com posar un punt i final a aquesta etapa. Una hora esperada i alhora temuda (per la voluntat de no descuidar-me de ningú i de trobar les paraules adequades). Suposo que el més encertat és començar pel principi de la història, sense evitar el punt de nostàlgia que sento en aquests moments.

I... vet aquí que una vegada, en una xerrada sobre les sortides professionals dels biòlegs, van aparèixer les paraules "el futur és vostre". Aquests mots encoratjadors van commocionar el meu cervell i em conduïren fins a Bellvitge, concretament al despatx de qui les havia pronunciat, en Ramon Bartrons. Com a primer personatge d'aquesta història, Ramon, he d'agrair la teva generositat i calidesa humana, que em van fer sentir molt ben acollida tant en els inicis en el teu laboratori, com en el transcurs d'aquesta tesi. Gràcies per tot; per exemple, per haver-me posat en contacte amb en Jose Carlos.

Com a director de tesi, Jose Carlos, vull agrair-te moltes coses: haver confiat en mi, orientar-me sempre que ho he necessitat i, sobretot, per haver-me facilitat tant la conciliació familiar. Amb el temps he comprovat que darrera la teva façana anàrquica (per no dir anarquista) hi ha infinits coneixements científics diversos i una gran intel·ligència emocional. I amb tu, la Maria Molas. Ai Maria, com se t'ha trobat a faltar! Ets tot un referent! Sempre recordaré les xerrades que fèiem quan estàvem soletes al 4162 i la lassanya tan bona que vas preparar quan va néixer en Jan.

I en aquesta història d'aprenentatge (i no només de ciència), més llarga del previst, he tingut la sort de trobar un escenari com Bellvitge (o *Wellbeach* pels amics), ric en qualitat humana i amb un ambient de treball cooperant i agradable.

Primer de tot, vull recordar les persones del 4162, les més properes i de les quals sempre he rebut un gran suport i l'ajuda necessària per realitzar aquest treball. Moltíssimes gràcies a tots. A l'Àlicia, la meva *mestra*. Sempre he admirat la teva empenta i capacitat de treball. A en Francesc Xavier Blasco, icona de la "generació digital", noble i sempre disposat a ajudar. A Sandra, ha sido un placer compartir historias científicas, filosofales y personales contigo; espero seguir haciendolo. A l'Andy, gran emprenedor, gran persona i amb qui he après més de ciència. Arribaràs lluny! A la Jana, we have invented some new english words, but working with you has been wonderful; eres un pozo de sabiduría (y nuestra médico particular)... *dobredobre*. A la Petra, although we haven't shared lab time, I think you are a very nice person. Good luck!

Cal no oblidar que el 4162 està ubicat a la Unitat de Biofísica. Moltes gràcies a tots els biofísics! Especialment a en Jordi Bermúdez, pel suport científic i personal. A en Jordi Boada, l'Edu Cuesta i la Roser Calafell, per haver compartit l'espai i la vostra sabiduria en hepatòcits i respirometria. No em descuido de la Teresa, una persona entranyable i bona companya.

Moltes gràcies als cosinets del 4165 (dic cosinets, perquè sempre m'hi he sentit molt vinculada ja que és on i amb qui vaig fer els primers experiments a Bellvitge). En tinc els records més divertits. A la Mercè Obach, una persona increïble i alegre, sempre amb un somriure als llavis. A en Joan Duran, "la cadenera de Bellvitge". A la Marta Gómez, amb totes les frases fetes i

fenòmens parasitològics..., i amb qui vaig compartir les clonacions i *lligamentes*. A la Nieves, a la persona *alternativa* més bona que es pugui imaginar. A les adquisicions més recents, Laura i Miguel Angel, encantadors. A l'Àurea, amb qui hem compartit embarassos i històries de mames. I especialment, perquè ets una persona molt important per a mi i a qui admiro, a l'Anna Manzano: ets el sol després d'un dia de pluja!

Moltes gràcies a tota la gent del 4171, tant als cap de grup Santi Ambrosio, Francesc Ventura i Francesc Vinyals, com als post-doc Nelson i Sílvia Ruiz, com als doctorands (la majoria d'ells ara ja doctors) Cristina Gómez, Rakel, Cristina Gamell, Roser Francisco, Cristina Lacasa, M^a José i Eddie. Una menció particular pels *sevillanos* amb qui vaig compartir els cursos de doctorat: la Bea i l'Antonio. Una altra menció pels meus bons amics Arnau i Pol (padrí ideal), dues persones especials per a mi.

Moltes gràcies al personal del laboratori 4114, amb qui hem compartit anticossos, entre altres coses. Al cap de grup Jose Luís Rosa, a en Francesc García, Elena, Ouadah, Eduard Casas, Roser Peiró, Fabiola, Irantzu i Mònica.

Un fort agraïment també per a tota la gent de la unitat de Fisiologia. A en Jordi Llorens i la gent del seu grup, sobretot en Pere Boadas, gironí com jo; al grup d'en Manel Chiva i al grup de l'Avelina i la Pepita, amb totes les noies que els componen: Tatiana, Rut, Roser Mir, Fina i Kathryn.

A la gent del 4175, Joan Gil, Biel, Montse Barragán, Clara, Dani, Llorenç, Antonio, Ana María, Mercè de Frías, Diana, Alba i Camila.

Moltes gràcies també a les persones que ens faciliten la feina: la súper-tècnic del Departament, Esther Adanero; el secretari, Josep Maria Franquesa; i el personal dels Serveis Científic-Tècnics de Bellvitge, l'Esther Castaño i en Benja.

Bufo, m'adono que he tingut el privilegi de conèixer molta gent durant aquests anys a Bellvitge... Però fora de l'escenari, entre bambolines, hi ha hagut moltes altres persones que han impulsat la meua vida i m'han animat a prosseguir l'aventura en alguns moments (no tot són flors i violes).

Les meves *germanetes de pis*, l'Imma, la Sílvia Feixas i l'Anna P, que espero que m'acompanyin en moltes altres aventures perquè me les estimo com si fossin de la meua família. També la Judit, i la Sílvia Serra.

El club de mames Terradet: Sílvia, Núries, Sara, Isa, Bet i Eniko, pels soparets terapèutics que fem i que espero que continuem fent. I no em descuido de l'Anna Riba i del Pipo, no, "*els meus consogres*", perquè conèixer-vos ha estat un regal del cel. Us he d'agrair tantes coses... sou persones excepcionals!

La meua família que tot i no acabar d'entendre ben bé què faig sempre m'han fet costat i s'han preocupat per mi. Sobretot els meus pares, que m'ho han donat tot, tot i tot i més, sense esperar res a canvi. No hi ha espai per agrair tot el que heu fet per mi... Us estimo.

A la Martina, en Jan i la Queralt. Amb vosaltres aquesta tesi ha durat moooooolt i moooolt, però m'heu fet infinitament feliç. És genial veure el món a través dels vostres ulls, i agraeixo els esforços que feu per entendre a què em dedico ("la meua mare cura ratolins"). Vosaltres sou

amb qui més he après, sobretot de mi mateixa. Amb una N=3, puc concloure que sou el millor experiment que faré en la meua vida.

I el meu puntal principal, en Joan. Ai Joan, què dir-te si ho saps tot de mi...; ets el meu amor, el meu amic, el meu conseller... Amb les ganes que teníem que arribés aquest moment! Ja està. Gràcies per la teua paciència infinita i per estimar-me. Quin serà el proper objectiu? Amb tu al meu costat, tot és possible.

I arribats al final de tota història cal dir:

*Vet aquí un gat i vet aquí un gos, aquest conte s'ha fos.
Vet aquí un gos i vet aquí un gat, aquest conte ja s'ha acabat.*

ÍNDIX DE CONTINGUTS

INTRODUCCIÓ

1. HOMEÒSTASI DE GLUCOSA.....	-19-
2. EL PAPER DEL FETGE EN EL METABOLISME DE LA GLUCOSA.....	-23-
A. En estat absortiu.....	-23-
B. En estat de dejuni.....	-28-
2.1 Zonació metabòlica del fetge.....	-31-
A. Organització estructural del fetge.....	-31-
B. Organització funcional del fetge.....	-33-
C. Zonació estàtica <i>versus</i> zonació dinàmica.....	-46-
D. Causes de la zonació hepàtica.....	-47-
E. Implicacions de la zonació hepàtica.....	-54-
3. GLUCOCINASA, ENZIM CLAU EN L'HOMEÒSTASI DE LA GLUCOSA.....	-55-
3.1 Estructura i propietats cinètiques de la glucocinasa.....	-56-
3.2 Regulació de la glucocinasa.....	-59-
A. Regulació transcripcional.....	-59-
B. Regulació post-transcripcional.....	-63-
3.3 Funció biològica de la glucocinasa als teixits on s'expressa.....	-73-
3.4 Patologia molecular de la glucocinasa.....	-78-
3.5 Estudis en models animals.....	-81-
A. Genosupressió de la glucocinasa.....	-81-
B. Sobreexpressió de la glucocinasa.....	-83-
4. DIABETIS MELLITUS.....	-89-
4.1 Patofisiologia de la Diabetis Mellitus.....	-89-
A. Diabetis de tipus 1.....	-89-
B. Diabetis de tipus 2.....	-90-
4.2 Tractament de la Diabetis Mellitus.....	-93-
A. Tractaments convencionals.....	-93-
B. Teràpia gènica de la Diabetis Mellitus.....	-97-
4.3 Augment de l'activitat glucocinasa com a teràpia de la Diabetis Mellitus.....	-107-
A. Sobreexpressió de la glucocinasa al fetge diabètic.....	-108-
B. Activadors sintètics de la glucocinasa (GKAs).....	-112-
Reflexió final.....	-119-

OBJECTIUS -125-

RESULTATS

CAPÍTOL 1: SOBREXPRESSIONIÓ DE LA GLUCOCINASA A LA ZONA PERIVENOSA DEL FETGE

Introducció.....	-133-
1. Sobreexpressió de la glucocinasa en el fetge perivenós de ratolins sans.....	-136-
1.1 Estudi a llarg termini de la sobreexpressió de glucocinasa al fetge de ratolins sans.....	-140-
Discussió.....	-158-
2. Sobreexpressió de la glucocinasa al fetge perivenós de ratolins amb diabetis de tipus 1.....	-166-
Discussió.....	-174-

CAPÍTOL 2: SOBREXPRESSIONIÓ DE LA GK_{A456V} A LA ZONA PERIVENOSA DEL FETGE

Introducció.....	-179-
1. Obtenció i Avaluació <i>in vitro</i> de la GK_{A456V} de rata.....	-180-
2. Sobreexpressió de la GK_{A456V} al fetge perivenós de ratolins sans.....	-185-
2.1 Estudi a llarg termini de la sobreexpressió de GK _{A456V} en ratolins sans.....	-188-
Discussió.....	-208-
3. Sobreexpressió de GK_{A456V} al fetge perivenós de ratolins amb diabetis de tipus 1...-	-215-
Discussió.....	-227-

DISCUSSIÓ GENERAL -237-

CONCLUSIONS -249-

MATERIAL I MÈTODES

TÈCNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR

1. Vectors plasmídics.....	-255-
2. Manipulació de bacteris	
2.1. Soques bacterianes.....	-255-
2.2. Creixement líquid/sòlid.....	-255-
2.3. Preparació de cèl·lules competents.....	-256-
2.4. Transformació de cèl·lules competents per xoc tèrmic.....	-257-
2.5. Preparació d'jestocs de glicerol.....	-257-

3. Obtenció i Anàlisi de DNA	
3.1. Minipreps, Maxipreps i Megapreps.....	-258-
3.2. Manipulació enzimàtica del DNA.....	-259-
3.3. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa.....	-260-
3.4. Aïllament i purificació de fragments de DNA.....	-260-
3.5. Construcció de molècules híbrides de DNA: Lligació.....	-260-
3.6. Mutagènesi dirigida.....	-262-
3.7. Seqüenciació de DNA.....	-264-
3.8. Purificació de DNA.....	-264-
4. Obtenció i Anàlisi de RNA	
4.1. Anàlisi del RNA.....	-266-
4.2. Anàlisi dels nivells de mRNA per PCR quantitativa a temps real.....	-267-

TÈCNIQUES DE CULTIU CEL·LULAR I EXPERIMENTS *IN VITRO*

1. Línies cel·lulars.....	-270-
2. Transfeccions	
2.1. Amb PEI.....	-271-
2.2. Amb Lipofectina.....	-272-
3. Aïllament i cultiu primari d'hepatòcits de rata.....	-272-

MODELS ANIMALS I EXPERIMENTS *IN VIVO*

Models animals.....	-276-
Transferència gènica hidrodinàmica.....	-276-
Mesura de la glicèmia.....	-277-
Dejuni.....	-277-
Test de tolerància intraperitoneal a la glucosa.....	-277-
Gàbies metabòliques.....	-277-
Experiment de radioactivitat.....	-278-
Anestèsia, eutanàsia i presa de mostres.....	-278-

ANÀLISI DE PROTEÏNES

1. Preparació d'homogenats.....	-280-
2. Quantificació de la concentració de proteïna.....	-281-
3. Separació i detecció de proteïnes per Western Blot.....	-282-

TÈCNIQUES IMMUNOLÒGIQUES

1. Immunocitoquímica d'hepatòcits en cultiu primari.....	-288-
2. Preparació de mostres histològiques.....	-289-
3. Immunohistoquímica.....	-290-

DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES

Activitat GK.....	-292-
Activitat Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.....	-293-
Determinació de paràmetres sèrics	
Determinació de glucosa.....	-294-
Determinació d'insulina.....	-294-
Determinació de GPT.....	-295-
Determinació d'àcids grassos no esterificats, triglicèrids, beta-hidroxibutirat, colesterol i lactat.....	-295-
Determinació de IGFBP-2.....	-295-
Determinació de metabòlits hepàtics	
Glicogen.....	-295-
Triglicèrids.....	-296-
Lactat.....	-297-
Glucosa-6-fosfat.....	-298-
Glucosa lliure.....	-299-
Fructosa-2,6-bisfosfat.....	-299-
Nucleòtids intracel·lulars (AMP, ADP, ATP).....	-303-
Glutatió oxidat i glutatió reduït.....	-303-
Determinació de leptina en extractes de teixit adipós.....	-305-

DETERMINACIONS BIOFÍSiques

Respirometria d'alta resolució.....	-306-
-------------------------------------	-------

TÈCNiques DE BIOLOGIA CEL·LULAR

Separació de nuclis i citoplasma.....	-310-
---------------------------------------	-------

BIBLIOGRAFIA

-315-

ABREVIATURES

AA	Aminoàcids
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ADP	Adenosina 5'-difosfat
AGL	Àcids grassos lliures
ALT	Alanina aminotransferasa
AMP	Adenosina 5'-monofosfat
AMPK	Proteïna cinasa activada per AMP
ATP	Adenosina 5'-trifosfat
BAD	<i>Bcl-xl/Bcl-2-Associated Death Promoter</i>
β-HBA	Àcid beta-hidroxibutirat
BMP-9	<i>Bone morphogenetic protein 9</i>
cAMP	AMP cíclic
CCK	Colecistoquinina
ChREBP	<i>Carbohydrate response element binding protein</i>
CoA	Coenzim A
COX	Citocrom c oxidasa
CPT-1	Carnitina palmitoil transferasa-1
eIF2α	<i>α-subunit of eucaryotic translational initiation factor</i>
FAS	Sintasa d'àcids grassos
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FGF-21	<i>Fibroblast growth factor 21</i>
FOXO1	<i>Forkhead box O1</i>
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GIP	<i>Glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GK	Glucocinasa
GKA	Activador farmacològic de la glucocinasa
GKRP	Proteïna reguladora de la glucocinasa
GLP1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GLUT	Transportador de glucosa
G6Pasa	Glucosa-6-fosfatasa
GP	Glicogen fosforilasa
GS	Glicogen sintasa
GSH	Glutatió reduït
GSK-3	Glicogen sintasa cinasa 3
GSSG	Glutatió oxidat
HK	Hexocinasa
HIF-1α	Factor induïble per hipòxia 1α
HNF	<i>Hepatocyte nuclear factor</i>
IGFBP-2	<i>Insulin growth factor binding protein 2</i>
IL-6	Interleuquina
IPGTT	Test intraperitoneal de tolerància a glucosa

IRS-1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
L-PK	Piruvat cinasa de fetge
LXR-α	Liver X receptor α
MODY	<i>Maturity onset diabetes of the young</i>
NAD⁺	Nicotin adenin dinucleòtid, estat oxidat
NADH	Nicotin adenin dinucleòtid, estat reduït
NADPH	Nicotin adenin dinucleòtid fosfat
NFκB	Factor nuclear kappa B
PEPCK-C	Fosfoenolpiruvat carboxicinasos citosòlica
PFA	Paraformaldehid
L-PFK2	Fosfofructocinasa 2, isoforma hepàtica
Ub-PFK2	Fosfofructocinasa 2, isoforma ubíqua
PGC-1α	<i>PPAR gamma coactivator 1 α</i>
PHHI	<i>Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy</i>
PP1	<i>Protein phosphatase 1</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
RBP-4	<i>Retinol-binding protein 4</i>
ROS	Espècies reactives d'oxigen
SCD1	Estearoil-CoA desaturasa 1
SREBP-1c	<i>Sterol regulatory element binding protein 1c</i>
STZ	Estreptozotocina
TAB	Teixit adipòs blanc
TAG	Triglicèrids
TNF-α	Factor de necrosi tumoral α
TZD	Tiazolidinediones
VDAC	<i>Voltage dependent anion channel</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>

INTRODUCCIÓ

*Només sóc un especialista,
un expert que cada dia té més coneixements sobre menys coses.*

Els fantasmes del Trianon
Néstor Luján

1. HOMEÒSTASI DE GLUCOSA

El control del metabolisme energètic és crucial per al funcionament òptim de tots els òrgans i teixits. Entre tots els nutrients, la glucosa és la principal font d'energia que utilitzen les cèl·lules i es requereixen uns nivells mínims de glucosa en sang per garantir el funcionament normal de l'organisme. Alteracions de la glicèmia poden donar lloc a estats hiperglucèmics (que provoquen glicosilació de proteïnes i toxicitat a cèl·lules sensibles a glucosa) o hipoglucèmics (que provoquen que el cervell no disposi de la seva principal font d'energia) que poden esdevenir crítics per a la supervivència. Per tant, és necessari que existeixin mecanismes per mantenir la concentració de glucosa en sang en un rang fisiològic estret (glicèmia entre 4 i 7 mM) independentment de l'estat nutricional de l'individu.

Per aconseguir tal fita l'organisme disposa d'un complex sistema de senyalització del seu estat energètic en què hi estan implicats nutrients (glucosa, àcids grassos lliures, aminoàcids), hormones (ghrelina, incretines, insulina, glucagó, etc.), adipocines (leptina, resistina, adiponectina, etc.) i el sistema nerviós autònom. Aquests factors permeten establir una comunicació entre els òrgans implicats en el control de la glicèmia per tal que ajustin les seves funcions a les necessitats energètiques del moment:

- **l'estómac i l'intestí**: reben en primera instància els nutrients de la dieta. A la mucosa del tracte gastrointestinal existeixen cèl·lules enteroendocrines encarregades de secretar diverses hormones com la **gastrina**, la **ghrelina**, la **colecistoquinina (CCK)**, les **incretines** (com la *glucose-dependent insulinotropic polypeptide* GIP i el *glucagon-like peptide-1* GLP1), etc., que són importants en la regulació de la motilitat intestinal, l'absorció de nutrients i en la comunicació amb altres òrgans com el pàncrees endocrí i el sistema nerviós central. Alteracions en el patró de secreció d'aquestes hormones poden afectar l'homeòstasi de la glucosa [1, 2]. Tant **GLP1** com **GIP** promouen la biosíntesi d'insulina i la secreció d'insulina al pàncrees. Per altra banda GLP1 inhibeix la secreció de glucagó al pàncrees, el buidat gàstric i indueix sensació de sacietat al sistema nerviós central. GIP, per la seva banda, afavoreix l'emmagatzemament d'energia al teixit adipós. En contrast, la CCK i la gastrina no semblen regular directament els nivells de glucosa en sang però són importants perquè promouen la formació de noves cèl·lules β mitjançant l'estimulació de la neogènesi d'illots pancreàtics.
- **el pàncrees endocrí**: secreta diverses hormones molt importants en el control metabòlic. La principal és la insulina, produïda per les cèl·lules β situades als illots pancreàtics. La síntesi

d'insulina està controlada a diferents nivells i la seva secreció al torrent sanguini augmenta en incrementar els nivells de glicèmia (en situacions d'alimentació). Es tracta d'una hormona anabòlica per excel·lència, és a dir, estimula la captació de glucosa als diferents teixits i les vies d'emmagatzematge i de biosíntesi (glicogen al múscul i al fetge; TAG al fetge i al teixit adipós). Per altra banda, també té una funció senyalitzadora al sistema nerviós central implicada en el control de la ingesta. En situacions de dejuni, quan els nivells de glicèmia baixen, les cèl·lules α del pàncrees secreten glucagó el qual promou la mobilització de les reserves energètiques corporals i també estimula la síntesi *de novo* de glucosa (gluconeogènesi), amb la finalitat de mantenir els nivells adequats de glucosa circulant.

- **el fetge:** entre les seves diverses funcions, juga un paper central i vitalment important en la homeòstasi de glucosa perquè contínuament adapta el seu metabolisme a les necessitats energètiques globals de l'organisme. En situacions d'alimentació, la glucosa entra lliurement al fetge mitjançant el transportador GLUT-2. La pròpia glucosa així com la insulina secretada pel pàncrees, de forma individual o conjunta, s'encarreguen d'activar una sèrie de proteïnes i vies per tal d'acumular la glucosa en forma de glicogen i també de lípids. Així, en els estats post-absortius quan hi ha una disminució de la glicèmia i un increment de glucagó, s'activa la degradació de glicogen per mantenir els nivells de glicèmia i garantir la disponibilitat de fonts energètiques al cervell. Per altra banda el glucagó també fa entrar en funcionament les vies de producció de glucosa -gluconeogènesi- a partir de diversos substrats (lactat, alanina, piruvat, glicerol). A part d'ésser regulada a nivell hormonal (activada per glucagó i inhibida per insulina), la producció hepàtica de glucosa també està regulada a través del nervi vague. D'aquesta manera s'estableix una comunicació entre cervell i fetge: l'estat nutricional (p. ex. nivell d'oxidació lipídica) i/o la senyalització d'insulina a les neurones hipotalàmiques activen canals de potassi dependents d'ATP, senyal que, conduïda a través de les vies eferents del nervi vague cap al fetge, desemboca en una supressió de la gluconeogènesi hepàtica [3-5]. Addicionalment, altres grups han descrit la intercomunicació entre el fetge i altres òrgans perifèrics, com per exemple el teixit adipós o el pàncrees endocrí, a través de vies aferents del nervi vague [6-8].
- **el múscul esquelètic:** es tracta d'un dels principals teixits perifèrics implicats en la captació de glucosa perquè constitueix el 40% de la massa corporal i s'ha descrit que la seva contribució en la captació de glucosa circulant és aproximadament del 75%. El múscul - mitjançant l'acció de la insulina que indueix la translocació del transportador de glucosa GLUT-4 a la membrana cel·lular - capta la glucosa que ha superat el pas hepàtic. Un cop dins

la cèl·lula muscular, la glucosa és utilitzada o emmagatzemada en forma de glicogen per al consum propi (principalment per a la contracció muscular).

- **el teixit adipós**: constitueix l'altre teixit perifèric important en la captació de la glucosa circulant de forma dependent d'insulina. Com en el múscul esquelètic, la insulina indueix l'entrada de glucosa a l'adipòcit mitjançant l'activació de la translocació del GLUT-4 a la membrana cel·lular. Per altra banda la insulina activa la utilització de la glucosa per a la síntesi de TAG i inhibeix la lipòlisi. Clàssicament es considerava que la principal funció del teixit adipós era emmagatzemar l'energia sobrant de l'individu en forma de TAG i alliberar-la en forma d'AGL en situacions de privació nutricional. No obstant, aquesta visió del teixit adipós com un reservori d'energia passiu ja no és vàlida. Diversos estudis han demostrat que pot actuar com a teixit endocrí i exerceix un paper integrador del metabolisme a través de la secreció de pèptids bioactius, anomenats adipocines. Les adipocines afecten directament o indirecta la sensibilitat a la insulina de diversos teixits (fetge, múscul, cervell, pàncrees endocrí, etc), de manera que algunes d'elles tenen una acció que promou la disminució de la glicèmia (**leptina, adiponectina, visfatina, omentina**), i altres tendeixen a augmentar-la (**resistina, TNF- α , IL-6**) [9, 10]. A més, el teixit adipós expressa nombrosos receptors que li permeten respondre a diferents senyals hormonals i a senyals aferents del sistema nerviós central.
- **el cervell**: concretament a l'hipotàlem té lloc la integració dels senyals hormonals (insulina, leptina, ghrelina, etc.), dels senyals dels propis nutrients (glucosa, lípids i aminoàcids) i dels senyals neuronals provinents del sistema nerviós central i perifèric. El resultat d'aquesta integració serveix per a modular la ingesta i el balanç energètic corporal a través de la producció de neuropèptids i de la producció de senyals eferents del sistema nerviós autònom cap als òrgans perifèrics.
- **les glàndules suprarrenals**: són glàndules endocrines situades a sobre els ronyons i estan regulades directament pel sistema nerviós central a través de l'eix hipotàlem-hipòfisi. Tenen la funció de regular les respostes a l'estrès mitjançant la síntesi de corticoesteroides (principalment el cortisol) i catecolamines (sobretot adrenalina). Els corticoesteroides s'alliberen en grans quantitats en moments d'estrès, potenciant la gluconeogènesi i les vies catabòliques; per tant, provoquen un increment de la concentració de glucosa, d'aminoàcids i de lípids en sang. L'adrenalina, a través de la seva acció glicogenolítica en el fetge i en el múscul esquelètic, també provoca l'augment de la concentració de glucosa en sang amb la finalitat de disposar de substrats energètics per fer front a la situació d'estrès.

Tots aquests factors i teixits esmentats formen una complexa xarxa que permet el control adequat de la glicèmia i de l'estat energètic global de l'organisme (Figura 1). Alteracions en la funcionalitat de qualsevol d'aquests elements esmentats poden donar lloc a trastorns en l'homeòstasi de la glucosa, al desenvolupament d'intolerància a glucosa o a diabetis mellitus.

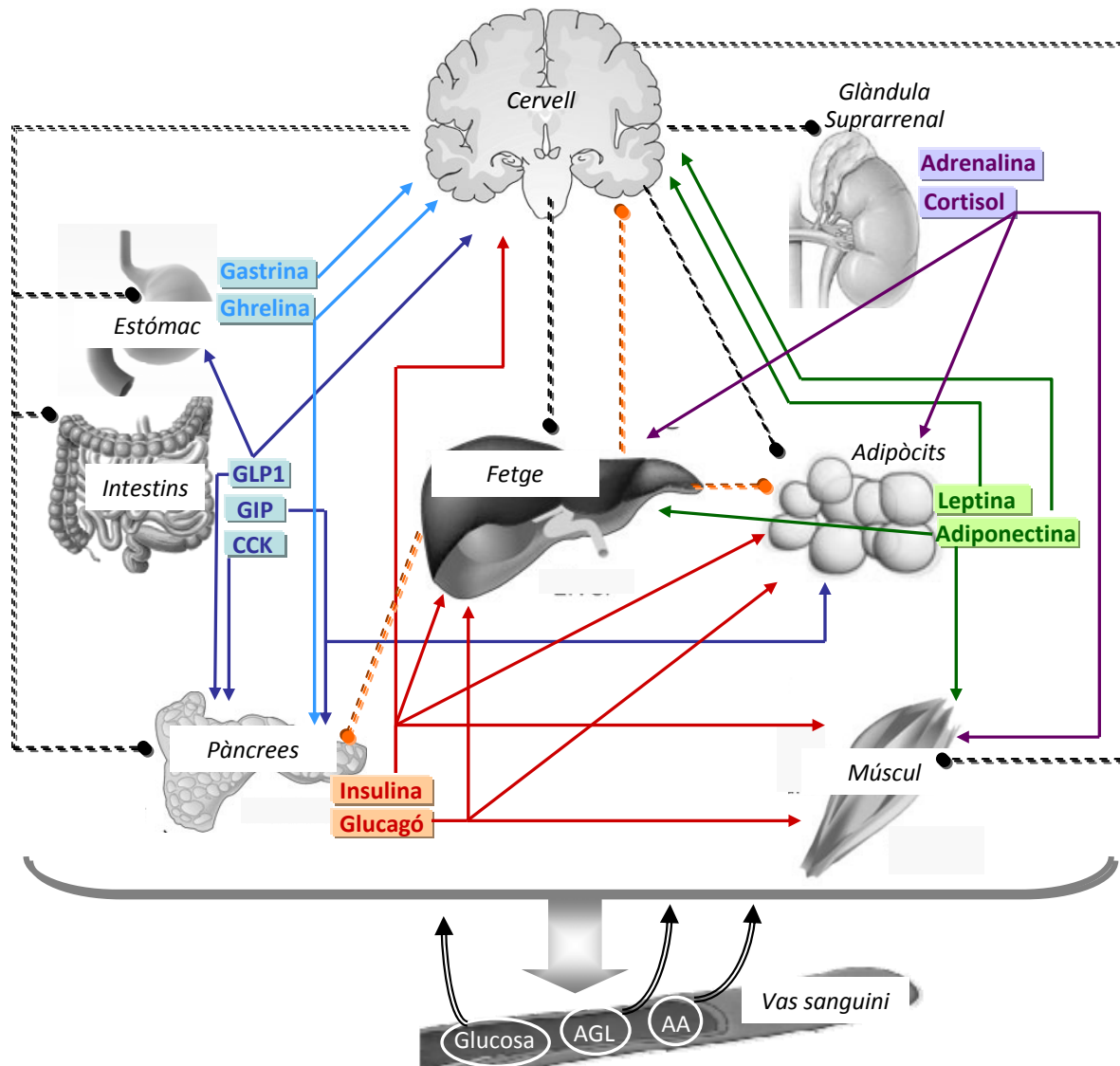


Figura 1. Esquema dels principals teixits i factors importants en el control de la glicèmia i de l'estat energètic global de l'organisme. El control de la glicèmia s'exerceix mitjançant una complexa xarxa de factors (hormonals i neuronals) i de nutrients que senyalitzen les necessitats energètiques de l'organisme als diferents òrgans, els quals adaptaran el seu metabolisme a les necessitats del moment i alhora enviaran senyals (hormonals, neuronals) als altres components del sistema, tal i com s'indica al text. En aquest esquema es presenten les hormones en requadres i, mitjançant fletxes contínues, s'indiquen les principals dianes d'acció d'aquestes hormones. Les comunicacions neuronals entre els teixits es representen per línies discontinuïques. Finalment, s'insinua que els propis nutrients que circulen al torrent sanguini (AGL: àcids grassos lliures, AA: aminoàcids) tenen una acció senyalitzadora als teixits. Per exemple, està descrit que els AGL poden afectar la secreció d'insulina al pàncrees, per altra banda tenen receptors al sistema nerviós central i, quan n'hi ha en excés, afecten la senyalització de la insulina al teixit adipós i al múscul.

2. EL PAPER DEL FETGE EN EL METABOLISME DE LA GLUCOSA

El fetge juga un paper pivot en el manteniment de l'homeòstasi energètica durant les transicions dejuni-alimentació que tenen lloc al llarg de la vida. Els hepatòcits expressen dotzenes d'enzims que són alternativament activats o inhibits en funció de si els nivells sanguinis de glucosa són alts o baixos. En els estats post-absortius (dejuni d'una nit), la producció hepàtica de glucosa assegura el manteniment de la glicèmia per a proporcionar glucosa al sistema nerviós central. En canvi, en períodes postprandials, el fetge s'ocupa de captar part dels glúcids de la dieta per a restaurar els dipòsits de glicogen. A més, quan les concentracions de glucosa en sang són elevades, el fetge té l'habilitat de sintetitzar lípids *de novo* a través de la via lipogènica. Aquesta captació neta de glucosa al fetge, la qual resulta de la inhibició de les vies de producció de glucosa simultàniament a l'activació de les vies de captació i anabolisme de glucosa, limita els increments postprandials de la glicèmia per tal que no siguin perjudicials per a la resta de l'organisme.

A. En estat absortiu

L'entrada de glucosa a l'hepatòcit està mitjançada pel transportador GLUT-2 (difusió facilitada) amb una K_m de l'ordre de 10 mM i que es troba present constitutivament en la membrana plasmàtica. Per tant, després d'un àpat ric en glúcids, l'increment de la concentració de glucosa a la vena porta (10-15 mM) resultarà en un increment proporcional de l'entrada de glucosa a l'hepatòcit. A continuació, la glucosa és fosforilada per la glucocinasa (GK) la qual també té una baixa afinitat per a la glucosa i no s'inhibeix per producte. Aquestes característiques cinètiques del transport i de la fosforilació de glucosa als hepatòcits impliquen que la taxa de fosforilació de glucosa és proporcional a la glicèmia. La glucosa-6-fosfat obtinguda pot entrar a continuació en diverses vies, principalment en la síntesi de glicogen, en la glicòlisi i en la via de les pentoses fosfat. Cal destacar que, al fetge, la funció principal de la glicòlisi no és proporcionar piruvat per a les vies oxidatives sinó per a la síntesi de lípids *de novo*. Com que la glucosa és el principal substrat usat per a la síntesi d'àcids grassos, els enzims de la via glicolítica poden ésser considerats com una extensió de la via lipogènica. Els elements encarregats d'orquestrar les vies metabòliques hepàtiques en l'estat absortiu són principalment la insulina, la pròpia glucosa i el sistema nerviós parasimpàtic.

- **Activació de la síntesi de glicogen:** el glicogen hepàtic està controlat per l'acció coordinada de dos enzims, la glicogen sintasa (GS) i la glicogen fosforilasa (GP) els quals estan regulats per fosforilació i

per moduladors al·lostèrics [11]. La GS és l'enzim limitant en la síntesi de glicogen i es troba inactivada per fosforilació en 9 residus per part de diverses cinases, incloses la PKA (*protein kinase A*) i la GSK3- β (*glycogen synthase kinase-3*). La insulina regula el metabolisme de glicogen perquè promou la defosforilació de la GS a través de l'activació de la PP1 (*protein phosphatase-1*, que al seu torn inhibirà la GP), i la inactivació de les cinases com GSK3- β . Per la seva banda, la glucosa també promou la síntesi de glicogen ja que el seu metabòlit glucosa-6P s'uneix a la GS ocasionant-li un canvi conformacional que fa que sigui un millor substrat per a les fosfatases i, per tant, promou una activació covalent de la GS [12, 13].

- **Activació de la síntesi lipídica al fetge:** en condicions de gran disponibilitat de glucosa i d'un increment de la insulinèmia, com té lloc en un estat absortiu, l'excés de glúcids de la dieta és convertit en lípids al fetge. Aquests TAG poden ésser emmagatzemats al fetge com a partícules lipídiques, o bé secretats al torrent sanguini en forma de VLDL (*very low-density lipoprotein*) per a ésser exportats al teixit adipós. La insulina, mitjançant el seu efector SREBP-1c (*Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c*), i la pròpia glucosa, mitjançant ChREBP (*Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein*), són responsables de la inducció de les vies lipogèniques: en primer lloc promouen l'activació de la metabolització de la glucosa per a proporcionar substrats com l'Acetil-CoA (via glicòlisi) i el NADPH (via pentoses-fosfat) necessaris per a la síntesi d'àcids grassos els quals, a continuació, seran incorporats en els TAG, reservori energètic (Figura 2).

Centrant-nos en els factors de transcripció lipogènics, **SREBP-1c**, tot i que inicialment fou descobert com un factor de transcripció que controla gens involucrats en la biosíntesi del colesterol, amb el temps ha emergit com el principal mediador de l'acció de la insulina sobre l'expressió de gens lipogènics (p.ex. FAS, SCD-1) i també de la GK [14], els quals contenen la seqüència SRE (*sterol regulatory elements*) al seu promotor. La insulina, a més d'activar la transcripció de SREBP-1c, també indueix el processament de la proteïna precursora de SREBP-1c (retinguda a la membrana del reticle endoplasmàtic) per poder obtenir SREBP-1c madura la qual pot entrar al nucli on activarà la transcripció de gens implicats en la lipogènesi [15] (Figura 3).

Diversos models animals corroboren el paper lipogènic de SREBP-1c: per una banda, ratolins transgènics que sobreexpressen SREBP-1c al fetge presenten esteatosi hepàtica [16], mentre que ratolins genosuprimits per SREBP-1c al fetge no presenten activació de les vies lipogèniques [17]. Per altra banda, l'acció de la insulina sobre SREBP-1c fou corroborada *in vivo* amb l'observació que rates amb diabetis tipus 1 (sense insulina) presentaven nivells baixos d'expressió de SREBP-1c, mentre que l'expressió augmentava en administrar insulina [18].

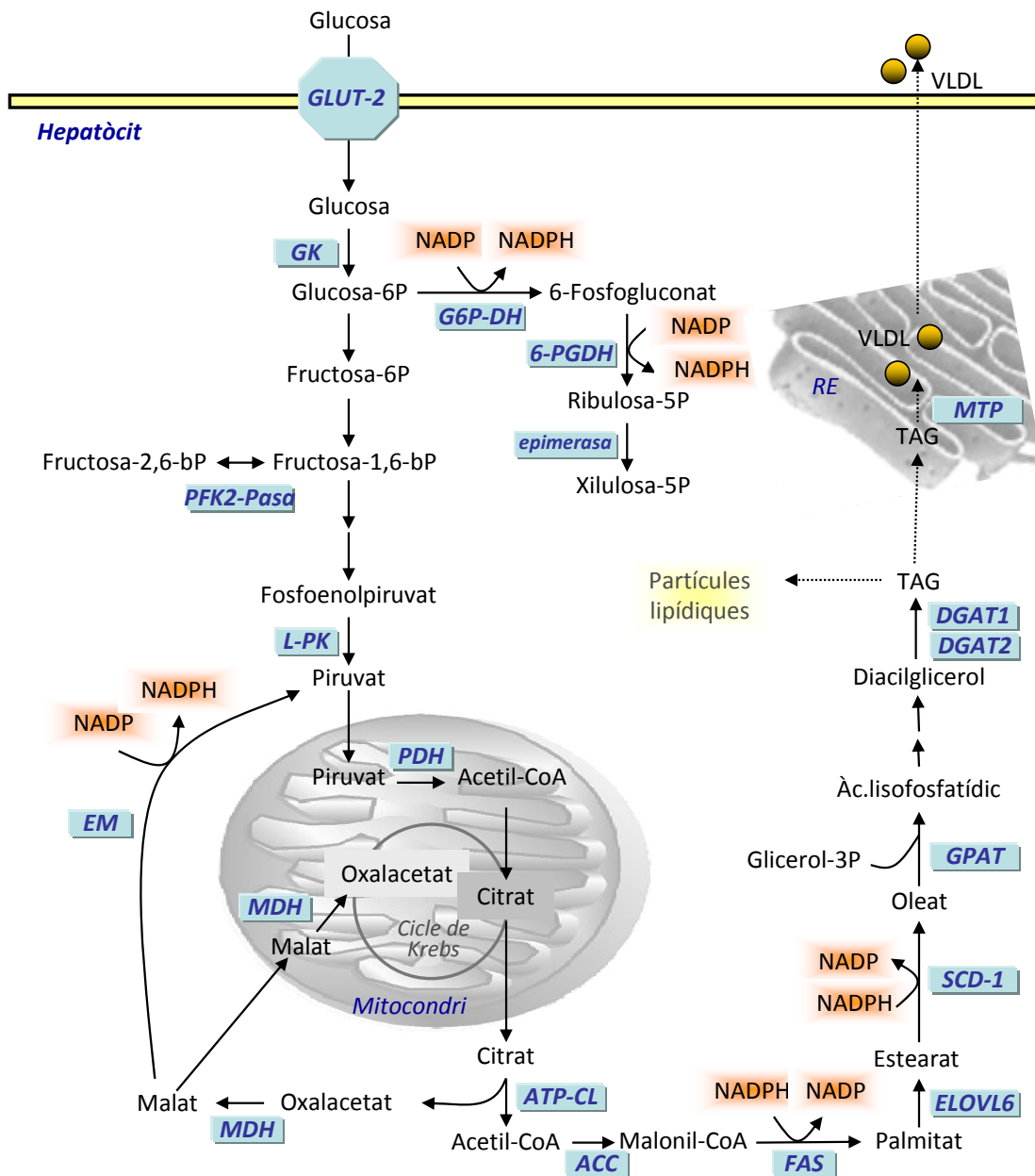


Figura 2. Esquema de la via lipogènica a partir de glucosa al fetge. Un cop dins de l'hepatòcit, la glucosa és metabolitzada per una banda per la via glicolítica fins a piruvat (GK = glucocinasa; PFK2-Pasa = 6-fosfofructocinasa-2-cinasa / fructosa-2,6-bisfosfat fosfatasa; L-PK = piruvat cinasa hepàtica). Per altra banda, la glucosa és oxidada per la branca oxidativa de la via de les pentoses fosfat per obtenir poder reductor (G6P-DH = glucosa-6-fosfat deshidrogenasa; 6-PGDH = 6-fosfogluconat deshidrogenasa). El piruvat obtingut per la via glicolítica entra al mitocondri per tal d'obtenir citrat (PDH = piruvat deshidrogenasa; MDH = malat deshidrogenasa; EM= enzim màlic). Amb el citrat s'inicia la via lipogènica pròpiament dita (ATP-CL = ATP citrat liasa; ACC = acetil-CoA carboxilasa; FAS = *fatty acid* sintasa) per obtenir àcids grassos, els quals després de patir diverses reaccions d'elongació i de desaturació (ELOVL6 = elongasa d'àcids grassos de cadena llarga; SCD-1 = estearoil-CoA desaturasa 1) seran convertits en triglicèrids (TAG) (GPAT = glicerol-3-fosfat aciltransferasa; DGAT = diacilglicerol aciltransferasa). Els triglicèrids poden ésser emmagatzemats al fetge o bé incorporats en les VLDL i secretats al torrent sanguini (MTP = *microsomal TAG transfer protein*).

Es creu que la insulina activa la transcripció de SREBP-1c mitjançant LXR- α (*Liver X Receptor*), el qual és un receptor nuclear dels oxisterols (derivats del colesterol) i que també està involucrat en l'activació de l'expressió de gens implicats en metabolisme del colesterol (Figura 3) [19]. Diversos estudis *in vivo* ja havien demostrat que la manca de LXR- α es traduïa en una disminució de l'expressió basal de SREBP-1c, FAS, ACC i SCD-1 [20, 21].

La majoria de gens de les vies glicolítica i lipogènica estan regulats també per la glucosa ja que contenen elements de resposta a glúcids en els seus promotors (ChoRE, *carbohydrate-response elements* ChoRE). El factor de transcripció capaç de reconèixer i unir-se a aquestes seqüències és **ChREBP** [22, 23]. En condicions basals, ChREBP presenta una fosforilació al residu Ser196 i es troba localitzat al citosol. En incrementar la glicèmia, entra glucosa als hepatòcits on és metabolitzada. Entre altres, incrementen els nivells del metabòlit xilulosa-5-fosfat el qual és responsable d'induir la defosforilació de ChREBP mitjançant l'activació de la fosfatasa PP2A (*protein phosphatase 2A*) i, un cop defosforilat, ChREBP és translocat ràpidament al nucli on activa la transcripció de ACC i FAS. ChREBP és particularment important per a la inducció de la piruvat cinasa hepàtica (L-PK), un dels enzims limitants de la glicòlisi, ja que la seva transcripció és exclusivament depenent de la glucosa [24] (Figura 3). Diversos models animals corroboren el paper lipogènic de ChREBP [25, 26].

Els factors de transcripció SREBP-1c i ChREBP funcionen de manera coordinada per regular el metabolisme hepàtic. Aquest sistema dual permet l'ús dels carbonis de la glucosa per a la síntesi de lípids només quan hi ha les condicions idònies de substrats i quan els dipòsits de glicogen han estat reomplerts.

- **Inhibició de la producció hepàtica de glucosa:** La insulina inhibeix la producció i l'alliberament de glucosa per part del fetge mitjançant el bloqueig de la glicogenòlisi i de la gluconeogènesi. Alguns dels efectes de la insulina són ràpids, com la fosforilació de GSK3- β la qual inhibeix la glicogenòlisi, mentre que d'altres són més a llarg termini i impliquen la modulació de la transcripció gènica. Principalment la insulina inhibeix la transcripció dels principals enzims gluconeogènics, com són la fosfoenolpiruvat carboxinasa (PEPCK-C) i la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). En aquest cas, l'acció de la insulina està mitjançada pel factor de transcripció FOXO1 (Forkhead box O1) el qual pertany a la família de factors de transcripció de localització nuclear forkhead box i s'expressa abundantment al fetge i a les cèl·lules β pancreàtiques. FOXO1 interacciona amb PGC-1 α (*PPAR-gamma coactivator 1-alpha*), essent aquesta interacció necessària per a la transcripció dels gens gluconeogènics [27]. En absència d'insulina, FOXO1 es troba directament unit als elements de resposta a insulina (IRE) del promotor del gen diana. En resposta a insulina, la fosforilació de FOXO1 per AKT comporta la seva translocació al citoplasma, inactivació, ubiquïtinització i degradació; per tant, s'inhibeix la

transcripció dels gens diana de FOXO1 [28, 29] (Figura 3). Simultàniament i de forma redundat, SREBP-1c també promou la inhibició de la transcripció del principal enzim gluconeogènic (PEPCK) [30].

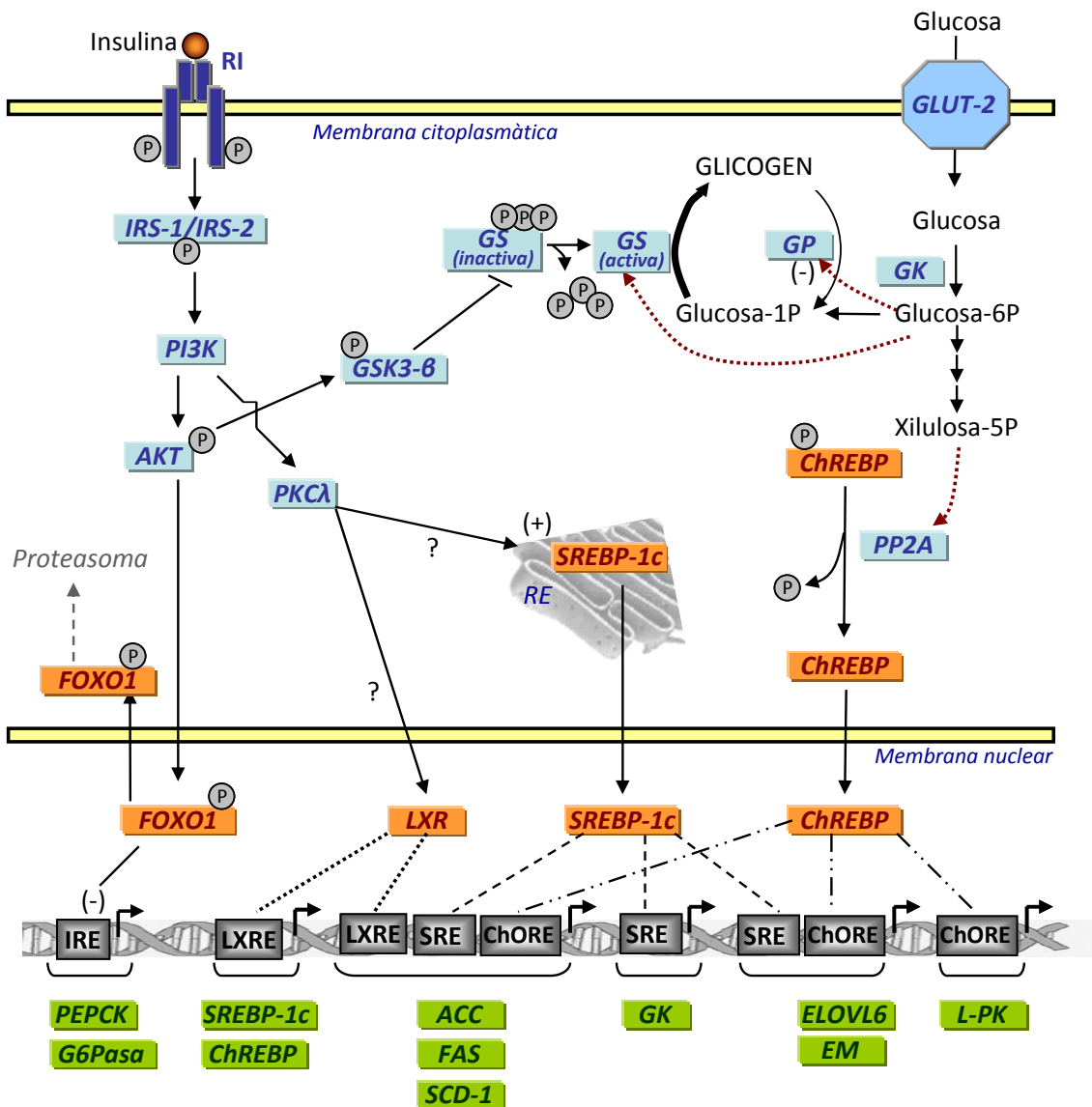


Figura 3. Regulació del metabolisme hepàtic en estat absortiu. En situació de gran disponibilitat de nutrients, tant la insulina com la glucosa dirigeixen les vies metabòliques hepàtiques per tal de promoure la captació i l'emmagatzematge de glucosa en forma de glicogen i de lípids al fetge. Per altra banda, inhibeixen la producció hepàtica de glucosa. 1) En primer lloc la insulina, en interaccionar amb el seu receptor (RI), estimula una sèrie de fosforilacions que condueixen a l'activació de l'AKT. A partir d'aquí, s'estimula la síntesi de glicogen via la inhibició de GSK3- β que implica una defosforilació de la glicogen sintasa (GS) la qual esdevé activa. En paral·lel, el metabolisme de la glucosa també estimula l'activitat GS i inhibeix la glicogen fosforilasa (GP) per afavorir la síntesi de glicogen. 2) La senyalització d'insulina promou la fosforilació de FOXO1 el qual serà translocat al citosol i degradat al proteasoma. D'aquesta manera s'inhibeix la transcripció dels gens que codifiquen per a proteïnes importants de la via gluconeogènica i glicogenolítica, com són la PEPCK i la glucosa-6-fosfatasa. 3) Les vies de senyalització de la insulina i de la glucosa actuen sinèrgicament per induir l'expressió dels gens implicats en la via glicolítica i lipogènica. El factor de transcripció SREBP-1c és el principal mediador de l'efecte de la insulina sobre la lipogènesi. Per una banda, la insulina activa la maduració de la proteïna SREBP-1c situada al

reticle endoplasmàtic (RE) i, a continuació, la forma madura de la proteïna pot entrar al nucli on s'unirà a les seqüències SRE dels promotors dels gens que codifiquen per a GK, ACC, FAS, ELOVL6, SCD1 i GPAT. Per altra banda, la insulina estimula la transcripció de SREBP-1c mitjançant l'activació de LXR. Per la seva banda, LXR també és un important regulador de la síntesi de lípids a través d'una activació transcripcional directa de ACC, FAS i SCD-1, els quals tenen seqüències LXRE als seus promotors. Un altre factor de transcripció clau en la lipogènesi és ChREBP. La seva activitat requereix un mecanisme de fosforilació/defosforilació que és determinat per l'activitat de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A), la qual és regulada per la concentració de xilulosa-5-P. Un cop defosforilada, ChREBP entra al nucli on s'uneix a les seqüències ChORE situades als promotors dels gens que codifiquen per L-PK (el qual és controlat exclusivament pel metabolisme de la glucosa), ACC, FAS, ELOVL6 i SCD1 (els quals requereixen l'acció sinèrgica de ChREBP i SREBP-1c). ChREBP també pot ésser activat transcripcionalment per LXR.

Per altra banda la insulina també regula indirectament la producció hepàtica de glucosa a través de:

a) la supressió de la lipòlisi en el teixit adipós, que suposa una disminució de la disponibilitat del glicerol (substrat gluconeogènic), b) la inhibició de la secreció de glucagó i c) l'activació de les vies hipotalàmiques de control de la homeòstasi de la glucosa.

De forma sinèrgica a la insulina, la utilització de la glucosa la fetge també exerceix una acció inhibidora sobre la gluconeogènesi. Aquesta acció està desencadenada per diversos metabòlits com la fructosa-2,6-bisfosfat [31-33] i la xilulosa-5-fosfat [34-36].

B. En estats de dejuni

En períodes de dejuni (incloses les estones que transcorren entre àpats) el fetge i, en menys extensió els ronyons i l'intestí prim, són responsables de la producció de glucosa necessària per garantir el subministrament energètic al cervell. Pel què fa al fetge, existeixen dues vies per obtenir glucosa: a) el trencament de les molècules de glicogen (glicogenòlisi) i b) la síntesi *de novo* de glucosa (gluconeogènesi) a partir de precursors com el lactat, aminoàcids i glicerol. La contribució exacta de cadascun d'aquests processos a la producció de glucosa roman controvertida. La glicogenòlisi té lloc durant les 2-6 hores després d'un àpat, en humans; mentre que la gluconeogènesi té una major importància en períodes prolongats de dejuni.

El dejuni implica una baixada de la glicèmia que desencadena un canvi del perfil hormonal, principalment una disminució de la secreció d'insulina a les cèl·lules β i un increment de la secreció de glucagó a les cèl·lules α dels illots pancreàtics. Al fetge, el glucagó interacciona amb el seu receptor de membrana acoblat a proteïnes que uneixen GTP i indueix un increment dels nivells intracel·lulars de AMP cíclic (cAMP), que suposaran una activació de la proteïna cinasa A (PKA). Per aquest mecanisme, el glucagó pot contrarestar els processos que s'havien activat per l'acció de la insulina i la glucosa [37]. Per exemple, l'increment de cAMP en els hepatòcits provoca una disminució de l'expressió de SREBP-1c. Alhora, PKA fosforila ChREBP la qual cosa suposa un segrest d'aquest factor de transcripció al citosol on no pot exercir la seva funció inductora de la lipogènesi. Per tant, la

inhibició de SREBP-1c i de ChREBP implica una reducció de la via lipogènica per tal d'estalviar energia en aquesta situació de privació nutricional.

Per altra banda el glucagó activa les vies de producció de glucosa que permetran l'alliberament de glucosa al torrent sanguini:

- **Activació de la glicogenòlisi:** la degradació del glicogen depèn directament de l'activitat enzimàtica de la glicogen fosforilasa (GP). La GP està activa després d'haver estat fosforilada per una cinasa específica anomenada fosforilasa cinasa la qual s'activa per fosforilació mitjançant la PKA. Per altra banda, la PKA fosforila la glicogen sintasa (GS) provocant-ne la inhibició. Per tant, el glucagó mitjançant l'activació de la PKA promou la degradació de glicogen al fetge i, a més, n'inhibeix la síntesi. L'últim pas de la glicogenòlisi està catalitzat per la glucosa-6-fosfatasa, que permet obtenir glucosa lliure la qual sortirà via GLUT-2 cap al torrent sanguini. Tal i com s'esmentarà a continuació, la glucosa-6-fosfatasa també intervé en l'últim pas de la via gluconeogènica i el glucagó n'estimula l'expressió (Figura 4).

- **Activació de la gluconeogènesi:** Alguns factors de transcripció, com el CREB (*cAMP response element binding protein*), són activats mitjançant fosforilació per PKA. Aleshores, CREB s'uneix als promotors dels gens que codifiquen per als principals enzims gluconeogènics: PEPCCK-C i glucosa-6-fosfatasa. Al mateix temps, CREB activa el cofactor PGC-1 α (*PPAR-gamma coactivator 1-alpha*) el qual s'ha mostrat en els últims anys com a un coactivador crític per a la transcripció de PEPCCK-C i la regulació de la gluconeogènesi hepàtica. L'acció estimuladora de PGC-1 α sobre la gluconeogènesi hepàtica requereix la seva unió a factors de transcripció com són FOXO1 i HNF4- α (*hepatocyte nuclear factor 4-alpha*) els quals tenen llocs d'unió als promotors dels principals gens gluconeogènics (Figura 4). El resultat d'aquest ball de factors de transcripció i coactivadors és l'activació de la síntesi *de novo* de glucosa.

A part dels senyals hormonals, en dejuni també existeix un senyal nutricional mediat per NAD⁺ el qual activa la deacetilasa Sirt1. Un dels substrats de Sirt1 és PGC-1 α de manera que s'estimula la seva interacció amb HNF4- α i es permet la transcripció dels gens gluconeogènics [38]. Sirt1 també deacetila FOXO1, retenint-lo al nucli i promovent la seva activitat transcripcional independentment de la senyalització d'insulina [39, 40] (Figura 4).

A part dels dejunis, la utilització dels magatzems de glucosa hepàtics també tenen lloc durant períodes d'exercici, en resposta a l'augment de la despesa energètica de l'organisme. En aquest cas, els elements activadors de la glicogenòlisi i de la gluconeogènesi són l'adrenalina, que com el glucagó provoca increments de cAMP als hepatòcits amb la conseqüent activació de PKA, i l'activitat del sistema nerviós simpàtic. Per altra banda, en situacions d'estrès també s'activa la gluconeogènesi

mitjançant el senyal de cortisol, que afavoreix la degradació de proteïnes i en conseqüència augmenten els substrats gluconeogènics.

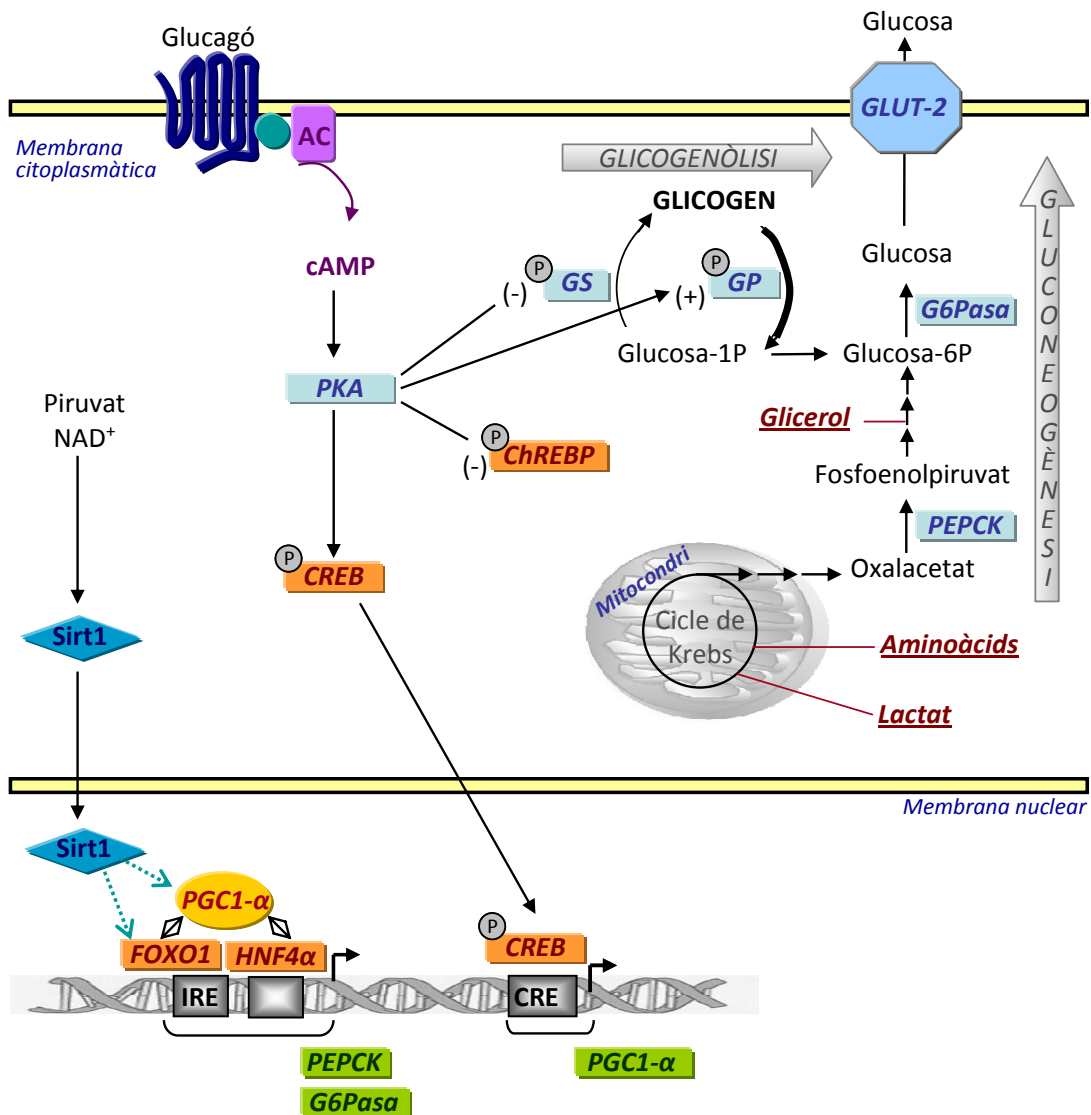


Figura 4. Regulació del metabolisme hepàtic en estat de dejuni. En unir-se al seu receptor de membrana, el glucagó indueix que l'adenilat ciclasa (AC) produeixi un increment de cAMP el qual implica una activació de la PKA. L'activitat cinasa de PKA provoca la inhibició de GS (glicogen sintasa) i de ChREBP, i, per altra banda, l'activació de GP (glicogen fosforilasa) i també de CREB la qual entra al nucli i activa la transcripció de PGC-1 α . El co-activador nuclear PGC-1 α afecta la regulació de la via gluconeogènica mitjançant la seva unió a factors de transcripció com FOXO1 i HNF4- α . La manca d'insulina és responsable de la localització nuclear de FOXO1 de manera que permet la seva acció reguladora de la gluconeogènesi. Per altra banda, Sirt1 mitjançant la seva activitat deacetilasa estimula FOXO1 i PGC-1 α i, en conseqüència, la gluconeogènesi. En vermell i subratllats, s'indiquen els substrats gluconeogènics.

2.1 Zonació metabòlica del fetge

A part de l'esmentada funció de manteniment de l'homeòstasi de glucosa, mitjançant l'eliminació o la producció de glucosa durant els períodes d'alimentació i de dejuni, el fetge realitza altres funcions molt diverses:

- a) producció de proteïnes sèriques, inclosos els factors de coagulació i proteïnes de transport com l'albumina i la transferrina
- b) extracció i degradació de proteïnes de la sang, glòbuls vermells i microbis
- c) processament d'àcids grassos i triglicèrids
- d) manteniment de l'homeòstasi del colesterol
- e) síntesi i inter-conversió d'aminoàcids no essencials
- f) degradació de tòxics endògens com l'amoni
- g) producció i excreció dels components biliars
- h) detoxificació d'agents xenobiòtics
- i) emmagatzemament de nombroses substàncies

El fetge, per tant, és un òrgan en què tenen lloc simultàniament diversos processos metabòlics. Existeixen cada vegada més evidències que aquests processos no tenen lloc en cada cèl·lula hepàtica, sinó que les cèl·lules hepàtiques desenvolupen diferents funcions segons la seva localització en el parènquima hepàtic, fenomen conegut amb el nom de **zonació hepàtica**. Es postula que la zonació té la utilitat de disminuir la despesa d'energia mitjançant la separació parcial de processos antagònics en cèl·lules diferents (com la gluconeogènesi i la glicòlisi) i, per altra banda, d'estimular la catàlisi de vies metabòlicament connectades en una sola cèl·lula (com la glicòlisi i la lipogènesi). A més a més, la zonació evita que tots els enzims involucrats en el metabolisme hepàtic s'hagin d'expressar a tots els hepatòcits.

A. Organització estructural del fetge

Per poder entendre la zonació hepàtica cal considerar l'arquitectura del fetge. Malgrat que sembli un òrgan uniforme, una visió més propera demostra l'existència de petites unitats estructurals i funcionals repetitives anomenades **acinus de Rappaport** (o lòbuls) que conformen el parènquima hepàtic. Els acinus tenen una estructura hexagonal al centre de la qual hi ha la vena central, i en cadascun dels 6 angles de l'hexagon hi ha una tríada hepàtica que conté un conducte biliar, una branca de la vena porta i una branca de l'artèria hepàtica. Una altra manera de definir l'acinus és com a la unitat microcirculatòria del fetge: la sang provinent del tracte gastrointestinal, rica en nutrients i possibles toxines, arriba a l'acinus per la vena porta situada a la tríada hepàtica, on també arriba sang

rica en oxigen provinent de l'artèria hepàtica. Des de la tríada hepàtica, la sang viatja a través de capil·lars petits anomenats **sinusoids** que recorren entre rengles d'hepatòcits i arriba a la vena central de l'acinus. Les venes centrals dels diferents acinus convergeixen en la vena hepàtica que finalment condueix cap a la vena cava (Figura 5).

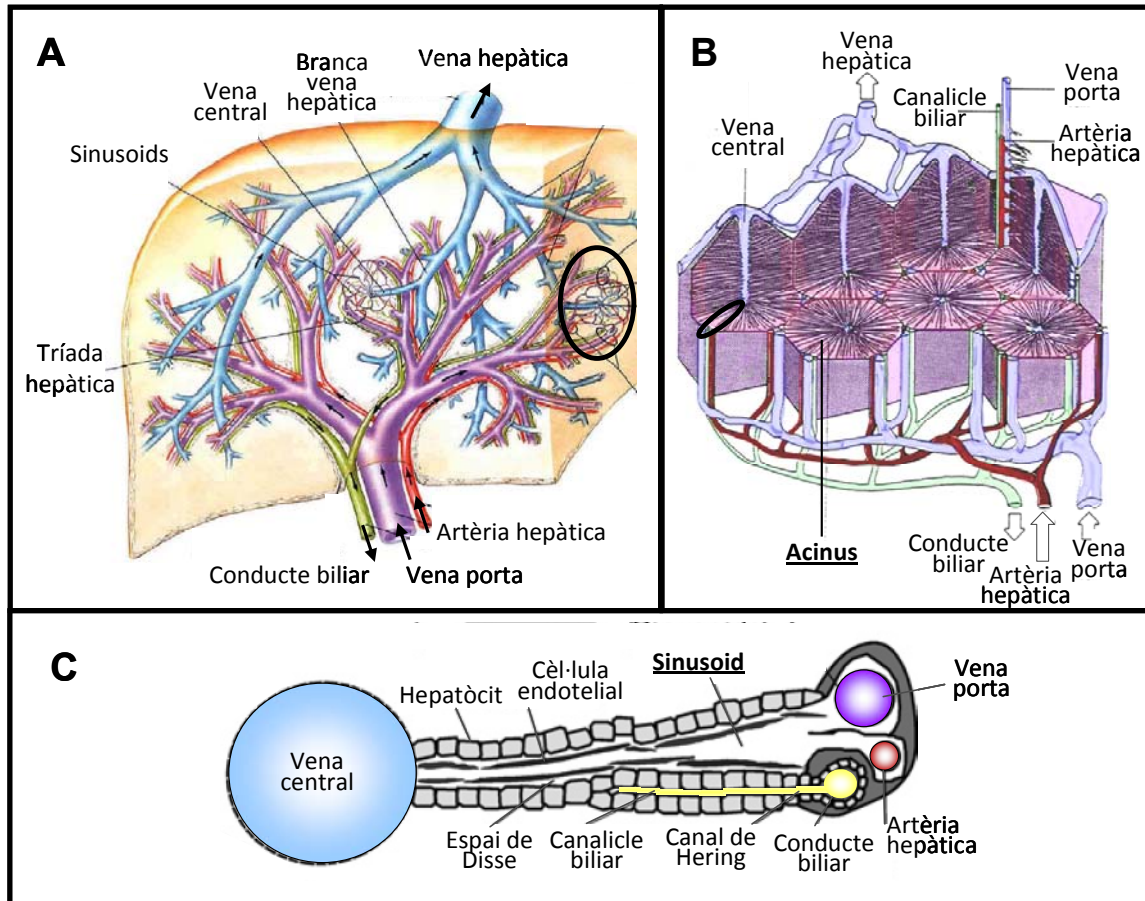


Figura 5. Diagrama de l'arquitectura del fetge adult dels mamífers. (A) Representació de la irrigació sanguínia del fetge, on es pot apreciar el sistema ramificat dels vasos sanguinis. Les fletxes indiquen la direcció del flux sanguini. **(B)** Detall de la zona encerclada a la figura (A) en què s'aprecia l'organització del parènquima hepàtic en acinus hexagonals. Cada acinus està centrat al voltant d'una vena central. A cada cantonada de l'hexagon hi ha la tríada hepàtica que està composta per una vena porta, una artèria hepàtica i un conducte biliar. **(C)** Detall de la zona encerclada a la figura (B) on es representa l'eix portocentral de l'acinus hepàtic. La sang entra a través de la vena porta i l'artèria hepàtica i flueix al llarg dels sinusoids en direcció a la vena central. Rengleres d'hepatòcits s'estenen entre la vena central i la tríada hepàtica. La transferència de materials entre la sang i els hepatòcits té lloc a l'espai de Disse. Els canalicles bilis transporten la bilis des dels hepatòcits fins al conducte biliar. (Figures obtingudes del web i modificades).

Els sinusoids estan formats per cèl·lules epitelials que formen una barrera entre la sang i els hepatòcits. L'espai estret que existeix entre aquests dos tipus cel·lulars s'anomena espai de Disse. Pel que fa als **hepatòcits**, constitueixen el 80 % de la massa cel·lular del fetge i desenvolupen la major part de les funcions associades amb el fetge. Estan ordenats en fileres que recorren entre la tríada

hepàtica i la vena central, d'unes 20 cèl·lules de llargada i de 1-2 cèl·lules de gruix. Els hepatòcits són cèl·lules polaritzades: per una banda estan en contacte amb els sinusoids, mentre que per la part oposada (apical) formen la membrana canalicular. Els canalicles biliars, petits canals compresos entre hepatòcits adjacents, transporten bilis al conducte biliar intrahepàtic en una direcció oposada a la del flux sanguini del sinusoid. La regió de transició entre el canalicle i els conductes biliars intrahepàtics s'anomena canal de Hering, que són canals estrets formats per hepatòcits i cèl·lules epitelials del conducte biliar. Aquests conductes biliars intrahepàtics convergeixen en un conducte biliar comú que transporta la bilis tant a la vesícula biliar (per a l'emmagatzemament) com directament a l'intestí prim.

A més dels hepatòcits, que són les cèl·lules majoritàries del fetge, el teixit hepàtic també conté:

- a) **cèl·lules endotelials del sinusoid**, molt importants per a l'intercanvi de materials entre la sang i l'espai de Disse, i es caracteritzen per tenir un epiteli fenestrat.
- b) **cèl·lules epitelials del conducte biliar**, a diferència del canalicle biliar que està format exclusivament pels repelcs de la membrana dels hepatòcits, els conductes biliars tenen una estructura cel·lular pròpia.
- c) **cèl·lules de Kupffer**: són macròfags residents al fetge que es troben units a la banda luminal dels sinusoids. Tenen una forma variable i poden emetre protusions que arriben a l'espai de Disse. S'encarreguen d'eliminar eritròcits envellits i microbis del torrent sanguini gràcies a la seva alta capacitat fagocitària. A través de l'alliberament de citocines (TNF- α , IL-6, etc) tenen un paper molt rellevant en els processos inflamatoris del fetge.
- d) **cèl·lules de Ito**: són lipòcits, cèl·lules amb una elevada capacitat per emmagatzemar lípids i constitueixen el principal reservori de vitamina A de l'organisme. Per altra banda també produeixen proteïnes de la matriu extracel·lular.
- e) **cèl·lules de Pit**, les quals són limfòcits granulars grans residents al fetge. Es localitzen unides a la superfície luminal dels sinusoids i presenten amb una elevada activitat de tipus citotòxica no dependent d'anticòs (*natural killers*).

B. Organització funcional del fetge

En contrast amb l'aparença uniforme dels hepatòcits de l'acinus observats al microscopi òptic, diversos estudis morfològics, histoquímics i bioquímics que s'han anat realitzant des del 1846 han revelat que existeixen diferències en l'estructura subcel·lular, en l'expressió gènica i en el contingut enzimàtic segons si els hepatòcits estan situats a la zona propera a la vena central (regió perivenosa) o a la zona propera a la tríada hepàtica (regió periportal) de l'acinus. En conseqüència, l'acinus pot ésser dividit en dues zones segons la localització dels vasos sanguinis: periportal i perivenosa, les

quals ahora poden ésser subdividides en zona proximal i zona distal. Segons la seva localització en l'acinus, els hepatòcits tindran unes capacitats metabòliques diferents que són la base del concepte de **zonació metabòlica** engendrat per Jungerman.

APÈNDIX 1: Tècniques d'estudi de la zonació hepàtica

1. **Microscopia:** S'han realitzat anàlisis morfològiques de micrografies electròniques per demostrar les diferències subcel·lulars entre els hepatòcits periportals i els perivencosos, les quals indiquen heterogeneïtat zonal de funcions.
2. **Hibridació in situ (mRNA), o histoquímica (activitat) o immunohistoquímica (proteïna) en microseccions de fetge:** S'han realitzat estudis histoquímics per a visualitzar activitats enzimàtiques o concentracions de metabòlits en les cèl·lules parenquimals; però té l'inconvenient que poden aparèixer problemes en la fixació del teixit. Les tècniques immunohistoquímiques s'apliquen per a detectar proteïnes o altres antigens quantitativament, sense tenir en compte si són funcionalment actives.
3. **Determinacions bioquímiques en teixit microdisseccionat:** es poden realitzar microdisseccions de fetge fresc o bé congelat i assecat per a preparar mostres d'hepatòcits periportals i perivencosos. Usant el teixit sec, es poden determinar essencialment totes les activitats metabòliques i les concentracions de metabòlits.
4. **Tècniques no invasives mitjançant l'ús d'electrodes:** els electrodes poden ésser situats a la superfície d'àrees periportals o perivencoses, i permetre la determinació de canvis redox zonals o de consum d'oxigen en determinades condicions metabòliques.
5. **Hepatòcits aïllats i cultivats en condicions similars a la zona periportal o a la zona perivencosa:** En determinats experiments s'han usat condicions de pressió parcial d'oxigen típiques de la zona perivencosa i de la zona periportal. En altres estudis, els hepatòcits aïllats s'han cultivat en presència d'elevades concentracions de glucagó per tenir el patró periportal, i un altre grup d'hepatòcits aïllats s'ha cultivat en presència d'altres concentracions d'insulina per tenir un patró perivencós.
6. **Obtenció d'extractes d'hepatòcits periportals i hepatòcits perivencosos mitjançant un doble pols amb digitonina:** Les zones periportal i perivencosa poden ésser selectivament destruïdes en segons per un pols curt de perfusió amb digitonina en direcció anterògrada o retrògrada, respectivament [41, 42]. Concretament, la digitonina s'uneix al colesterol de la membrana plasmàtica i la desestabilitza, de manera que els hepatòcits perden el seu contingut citosòlic. Es recull l'elutit de la perfusió i s'hi poden mesurar els enzims i metabòlits alliberats, i fins i tot mRNAs. L'avantatge d'aquest mètode és que mitjançant l'aplicació d'un pols curt de digitonina a través de la vena porta, seguit d'un pols curt via la vena hepàtica, es poden obtenir elutits de la zona periportal i de la zona perivencosa d'un mateix fetge. Per altra banda, es tracta d'un mètode amb una elevada selectivitat, que permet una ràpida obtenció de mostres i una elevada reproducibilitat entre experiments.
7. **Aïllament d'hepatòcits periportals i hepatòcits perivencosos mitjançant perfusió amb digitonina/col·lagenasa:** Es basa en una perfusió amb digitonina selectiva d'una zona de l'acinus hepàtic, és a dir, en sentit anterògrad o retrògrad, i a continuació es realitza una perfusió amb col·lagenasa per obtenir els hepatòcits de la zona no malmesa. Els hepatòcits viables obtinguts es separen per centrifugació per gradient de densitat i poden ésser cultivats [43, 44]. En aquesta tècnica cal tenir en compte factors com la quantitat i la concentració de digitonina infosa, el fluxe, el temps i la temperatura, que poden fer variar els resultats.
8. **Aïllament d'hepatòcits i separació de les poblacions d'hepatòcits perivencosos i periportals per tècniques d'elutriació.** [45].
9. **Tècniques de perfusió.** Poden emprar-se diverses variables com la perfusió anterògrada o retrògrada, la infusió de substrats, la recollida de productes, l'anàlisi de fluxes, etc.

- **Zona periportal:** tal com ja s'ha esmentat, la zona periportal rep sang rica en nutrients i oxigen. S'ha determinat experimentalment que la pressió parcial d'oxigen en aquesta zona és de l'ordre de 65 mmHg. A més, la zona periportal rep el 100 % de la concentració d'hormones (insulina, glucagó, adrenalina, cortisol, hormones tiroidees, etc) del torrent sanguini. Per altra banda, s'ha descrit que aquesta regió presenta un major nombre de terminacions nervioses del sistema nerviós simpàtic [46, 47].

Les cèl·lules no parenquimals també presenten una distribució diferent al llarg de l'acinus. Les cèl·lules de Kupffer i les cèl·lules de Pit són més nombroses a la zona periportal, la qual cosa podria estar vinculada amb una major capacitat de defensa en aquesta regió perquè és on arriben en primer terme els possibles patògens i tòxics provinents del sistema digestiu. També es detecten més cèl·lules de Ito a la zona periportal, on estarien implicades en la propagació de les accions del sistema nerviós simpàtic i en la producció de matriu extracel·lular [46, 47].

Pel que fa a les característiques anatòmiques, els hepatòcits periportals difereixen dels perivenosos perquè tenen mitocondris més grans la qual cosa indica un major equipament per al metabolisme oxidatiu [48]. També s'ha detectat una major densitat del complex de Golgi i del reticle endoplasmàtic rugós. Els estudis de microscopia han revelat que el glicogen a la zona periportal té una aparença de grans agregats que sovint s'apleguen en àrees extenses.

Diversos treballs, en què s'ha determinat el contingut proteic o de mRNA dels principals components de les vies metabòliques (Taula 1), han permès definir que a la regió periportal predomina el metabolisme oxidatiu la qual cosa encaixa amb la major concentració d'oxigen que s'hi detecta. Principalment, hi té lloc la β -oxidació d'àcids grassos que permet obtenir suficient energia per a sustentar processos endergònics com la gluconeogènesi. També hi predominen les vies de catabolisme d'aminoàcids i la ureagènesi a partir d'aminoàcids.

- **Zona perivenosa:** la sang que hi arriba ha viatjat per un tram del sinusoid on els hepatòcits periportals han captat oxigen i substrats, i hi han alliberat productes. Experimentalment, s'ha pogut demostrar que la pressió parcial d'oxigen a la zona perivenosa és menor (35 mmHg) que la que es detecta a la zona periportal. El mateix succeeix pel contingut d'hormones (per ex. 50 % glucagó, 50 % cortisol, 20 % adrenalina, 50 % insulina) en comparació a la zona periportal [46, 47].

Les cèl·lules endotelials del sinusoid presenten una fenestració més petita i nombrosa de manera que la capacitat de filtració de la zona perivenosa és superior a la de la periportal. Per altra banda, les cèl·lules de Kupffer de la zona perivenosa, tot i estar presents en menor nombre, tenen una major activitat citotòxica i una menor activitat fagocítica.

Els hepatòcits d'aquesta regió són de la mateixa mida que els periportals, però els mitocondris que contenen són més petits, prims i llargs. Aquests hepatòcits comparativament també tenen un major

contingut de reticle endoplasmàtic llis. Per altra banda, s'ha descrit que el glicogen que s'hi emmagatzema es troba dispersat en rosetes aïllades escampades per tot el citoplasma i sovint està associat a les membranes del reticle endoplasmàtic llis [48].

La determinació de l'expressió de proteïnes i factors implicats en les principals vies metabòliques ha permès definir quins són els processos que tenen lloc majoritàriament a la zona perivenosa (Taula 1). La glicòlisi és un procés exergònic que no ha d'estar lligat al metabolisme oxidatiu, per tant pot estar localitzat a la zona perivenosa on hi ha una menor capacitat per al metabolisme oxidatiu. En la mateixa línia, també hi té lloc la lipogènesi la qual és un procés que no necessita del metabolisme oxidatiu. Hi predominen la ureagènesi a partir d'amoní i els processos de biotransformació o metabolisme de xenobiòtics.

Taula1 Recull bibliogràfic de les funcions i nivells d'expressió (mRNA i proteïna) d'enzims i de factors de transcripció en les zones periportal i perivenosa del fetge.

		Regió periportal		Regió perivenosa	
		mRNA	proteïna	mRNA	proteïna
Metabolisme glucídic					
GK	Glucocinasa				MMB, IHC [47], KMP [49]
	Sorbitol deshidrogenasa			qPCR [50]	
	Aldehid reductasa			qPCR [50]	
Pfkfb1	6-fosfofructo-2-cinasa /fructosa-2,6-bisfosfatasa			qPCR [50]	
L-PK	L-piruvat cinasa				MMB [47], IHC [51]
cPEPCK	Fosfoenolpiruvat carboxicinasa	InH [52], qPCR [50], qPCR [53], InH [54]	MMB, IHC [47], IHC [54], IHC [55]		
FBPase	Fructosa-1,6-bisfosfatasa	InH [56]	MMB, IHC [47], BqC [57]		
	Glucosa-6-fosfatasa		MMB [47], KMP [49]		
LDH	Lactat deshidrogenasa		KMB, MMB [47], BqC [57]		
Metabolisme lipídic					
	β -hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa		MMB [47]		
	Apolipoproteïna CII	qPCR [50]			
apoB	Apolipoproteïna B	InH [58]			
	ATP-citrat liasa	qPCR [50]	BqC [59]		MMB [47]
ACC	Acetil-CoA carboxilasa		BqC [59]		MMB [47], IHC [60], BqC [61]

	S14				IHC [60]
FAS	Àcid gras sintasa		BqC [59]		MMB [47]
	Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa				MMB, HC, MP [47]
	6-fosfogluconat deshidrogenasa				MMB [47]
	isocitrat deshidrogenasa			qPCR [50], qPCR [53]	KMP, MMB [47]
EM	enzim màlic	qPCR [53]			MMB, HC [47]
SCD1	Stearoil-CoA desaturasa 1	qPCR [53]			
	HMG-CoA reductasa		IHC [47]		
	HMG-CoA sintasa		BqC [62]		
	Colesterol-7- α hidroxilasa			InH [63], qPCR [53]	BqC [64]
	β -hidroxibutirat deshidrogenasa		MMB [65]		MMB [47]
Cpt1	Carnitina palmitoiltransferasa		BqC [57], BqC [61], BqC [62]		
	PPAR- α	InH [66]	IHC [67]		
Metabolisme d'aminoàcids					
Ser DH	Serina deshidratasa	NB [68], qPCR [50]	IHC [69]		
TAT	Tirosina aminotransferasa		MMB [47]		
	Aspartat aminotransferasa		MMB [47]		
	Alanina aminotransferasa		MMB [47], BqC [57]		
	Glicina descarboxilasa	qPCR [50], qPCR [53]			
	Uroconat hidratasa	qPCR [50]			
	gamma-glutamilttransferasa		BqC [57]		
Detoxificació d'amoni					
CPS	Carbamoil fosfat sintetasa	qPCR [53], qPCR [70]	IHC [47], IHC [71], IHC [55]		
	Ornitina carbamoiltransferasa		HC [47]		
	Ornitina aminotransferasa			qPCR [53], qPCR [70]	IHC [54], IHC [55], Per [72]
	Argininosuccinat sintetasa	qPCR [50]	IHC [47]		
	Arginasa	qPCR [50], qPCR [53]	ICH [47], IHC [55]		
GS	Glutamina sintasa			qPCR [53], qPCR [70], InH [54]	IHC [47], IHC [71], IHC [54], IHC [55]
	Glutamat deshidrogenasa				IHC, KMP, MMB [47], BqC [61], BqC [57]
GLT1	Transportador de glutamat 1			qPCR [53], qPCR [70]	IHC [55]

	Glutaminasa	InH [73], qPCR [53], qPCR [70]	BqC [73]		
Metabolisme oxidatiu					
	Succinat deshidrogenasa		KMP [47], BqC [57]		
	Malat deshidrogenasa		KMP [47]		
	Citocrom oxidasa		HC [47]		
	Citrat sintasa			qPCR [50]	BqC [57]
Metabolisme de xenobiòtics					
	Citocrom P450 (1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 2E1, 3A1)			qPCR [70],	HC, IHC, MP [47], IHC [74], IHC [71], IHC [55]
	Glutatió-S-transferasa			qPCR [50]	
	Sulfotransferasa			qPCR [50]	
Metabolisme protector					
	Glutatió peroxidasa		IHC [47]		
iNOS	NO sintasa induïble	InH [75]	IHC [75]		
Receptors hormonals					
D1	5'-deionidasa tipus 1				IHC [76]
TRβ1	Receptor d'hormona tiroïdea				IHC [76], IHC [54]
	Receptor d'insulina				IHC, BqC [77]
	Receptor de glucagó	NB [78]			
	Receptor 1a de l'arginina-vasopressina			qPCR [53]	
Altres					
	β-catenina				IHC [53]
APC	Adenomatous polyposis coli		IHC [53]		
RNAsa 4	Ribonucleasa 4			qPCR [53]	
	Axina 2			qPCR [53]	
Lect2	Quimiotaxina 2 leucocitària			qPCR [53]	IHC [71]
	E-cadherina		IHC [55]		
	IGFBP-1			InH [79]	
	IGFBP-2	InH [79]			

Llegenda de la taula 1. KMP (*kinetic microscope photometry*), IHC (*immunohistochemistry*), HC (*histochemistrhy*), MMB (*microdissection with microbiochemistry*), MP (*microscope photometry*), BqC (*bioquematic studies in hepatocytes*), Per (estudis de perfusió), InH (hibridació *in situ*), qPCR (PCR quantitativa), NB (Northern blot). Les referències anteriors al 1989 estan sintetitzades al review [47]

B.1. Zonació del metabolisme oxidatiu

Els substrats energètics principals (glucosa, aminoàcids i àcids grassos) són degradats inicialment a acetil-CoA el qual és finalment oxidat a CO_2 . La regió periportal està més ben equipada que la regió perivenosa per a dur a terme aquesta oxidació final: per una banda, els hepatòcits periportals estan en un ambient amb el doble de concentració d'oxigen que els hepatòcits perivenosos, a més, contenen un major volum de mitocondris així com elevades activitats dels enzims del cicle de Krebs (succinat deshidrogenasa) i de la cadena respiratòria (citocrom oxidasa) (Taula 1) [47].

Aquesta elevada capacitat per a l'oxidació final que existeix a la zona periportal està en concondància amb una major capacitat de metabolisme oxidatiu d'àcids grassos i aminoàcids. Teòricament és lògic trobar un major catabolisme a la zona periportal perquè aquests processos requereixen oxigen.

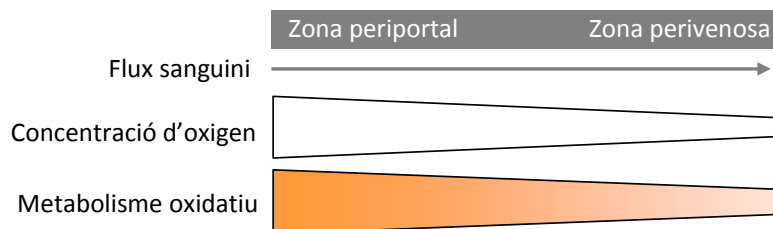


Figura 6. Representació esquemàtica de la zonació del metabolisme oxidatiu al fetge.

B.2. Zonació del metabolisme glucídic

L'homeòstasi de glucosa es manté mitjançant la síntesi de glicogen i glicòlisi durant els períodes absortius, així com amb la glicogenòlisi i gluconeogènesi durant els períodes post-absortius.

- **Metabolisme del glicogen:** la distribució de la glicogen sintasa i de la glicogen fosforilasa, principals efectors del metabolisme del glicogen, sembla ésser homogènia al llarg de l'acinus [80]. La formació i degradació de glicogen són aparentment regulades a nivell de disponibilitat de substrats que hi pugui haver a les dues zones de l'acinus. Als hepatòcits periportals, el glicogen és format a partir de substrats gluconeogènics, mentre que a la zona perivenosa és format a partir de glucosa; per tant, la zonació és el principal factor determinant que la via de síntesi de glicogen sigui directa o indirecta. En alimentació, la glucosa és captada principalment per les cèl·lules perivenoses, on s'usa per a sintetitzar glicogen i, quan els dipòsits de glicogen estan plens, es degrada a lactat. El lactat és transportat via circulació cap a les cèl·lules periportals on és convertit, via gluconeogènesi, a glicogen. A la fase post-absortiva, el glicogen primer es degrada a glucosa als hepatòcits periportals, després és degradat a lactat, principalment a la zona perivenosa. El lactat s'allibera a la circulació i quan arriba de nou a la zona periportal és usat com a substrat de la gluconeogènesi. Aquest sistema de síntesi i degradació de glicogen encaixa amb la observació que la degradació de glicogen comença

a la zona periportal i que, en canvi, el reompliment del magatzem de glicogen comença a la zona perivenosa [43, 81, 82]. En aquest context, cal tenir en compte que la glicogenòlisi està regulada per glucagó i els hepatòcits periportals i els perivenosos reben diferents concentracions d'aquesta hormona. Existeixen estudis que demostren que la zona periportal és més sensible a l'estimulació de la degradació de glicogen per part del glucagó [83, 84].

Si existeixen discrepàncies entre alguns estudis que usen digitonina, podrien explicar-se pel fet que la digitonina permeabilitza la cèl·lula al Ca^{2+} extracel·lular el qual pot activar la glicogen fosforilasa per promoure la degradació de glicogen.

- **Glicòlisi:** Els hepatòcits perivenosos tenen una major capacitat per a la degradació de glucosa a privat, ja que contenen major activitat i major quantitat de proteïna dels enzims glicolítics clàssics com són la GK i la L-PK [47]. També s'hi ha detectat major quantitat de mRNA de sorbitol deshidrogenasa i aldehid recutasa, els quals estan involucrats en la conversió de glúcids que proporcionen glucosa per a ésser metabolitzada via glicòlisi, i de la isoforma hepàtica de la PFK-2 (codificada pel gen *Pfkfb1*) que produeix fructosa-2,6-bisfosfat la qual és un metabòlit que actua d'activador al·lostèric de la glicòlisi [50] (Taula 1).

Ara bé, no s'observa zonació del mRNA de la GK ni de la L-PK [46, 50, 85, 86] la qual cosa indica que la zonació observada per aquests enzims està regulada a nivell post-traduccional. No obstant, existeixen estudis en què es demostra que la pressió parcial d'oxigen perivenosa afavoreix l'expressió de la GK en presència d'insulina [87], fet que encaixa amb la descripció que el gen de la GK s'expressa majoritàriament a la zona perivenosa en situacions de re-alimentació després d'un llarg període de dejuni [86, 88].

Malgrat la clara predominància d'enzims glicolítics a la zona perivenosa, existeixen estudis de perfusió amb digitonina/col·lagenasa que demostren una manca de zonació de la via glicolítica [43]. Per altra banda, un altre estudi demostra una distribució homogènia de la fructosa-2,6-bisfosfat en el fetge [89]. Cal tenir en compte que la fructosa-2,6-bisfosfat al fetge pot ésser produïda per diferents isoformes de l'enzim PFK-2 i que aquest metabòlit, a més de regular la via glucolítica, també regula la via gluconeogènica; per tant, és comprensible que s'expressi també a la zona periportal.

- **Gluconeogènesi:** Les cèl·lules periportals tenen una major capacitat per a la síntesi *de novo* de glucosa a partir de substrats de 3 carbonis tal i com es posa de manifest per l'elevada activitat dels enzims gluconeogènics que s'hi detecta (glucosa-6-fosfatasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa i PEPCK). A més a més aquestes cèl·lules presenten majors activitats de l'alanina aminotransferasa i de la lactat deshidrogenasa, les quals canalitzen l'alanina i el lactat cap a la via gluconeogènica (Taula 1). Com que la gluconeogènesi és un procés endergònic, és lògic que predomini a la zona periportal on està lligada al metabolisme energètic oxidatiu que preval en aquesta zona.

L'expressió dels gens gluconeogènics, com la PEPCK i la glucosa-6-fosfatasa, així com la dels enzims que metabolitzen els aminoàcids (serina deshidratasa, tirosina aminotransferasa, alanina aminotransferasa) i proporcionen substrats gluconeogènics, estan regulats principalment a nivell transcripcional. Els nivells de mRNA d'aquests gens són màxims després del període post-absortiu diari i en estat de dejuni, i són baixos en situacions d'alimentació i re-alimentació post-dejuni [82]. Només l'enzim gluconeogènic fructosa-1,6-bisfosfatasa presenta nivells de RNA i d'activitat que no s'alteren amb el ritme diari d'injesta/dejuni i a, més a més, no presenta zonació [50].

A diferència de la controvèrsia que pot existir sobre la zonació de la glicòlisi, la predominància de la gluconeogènesi a la zona periportal ha pogut ésser demostrada per totes les tècniques d'estudi emprades. Tant és així que la PEPCK i la tirosina aminotransferasa (TAT) s'empren com a marcadors periportals.

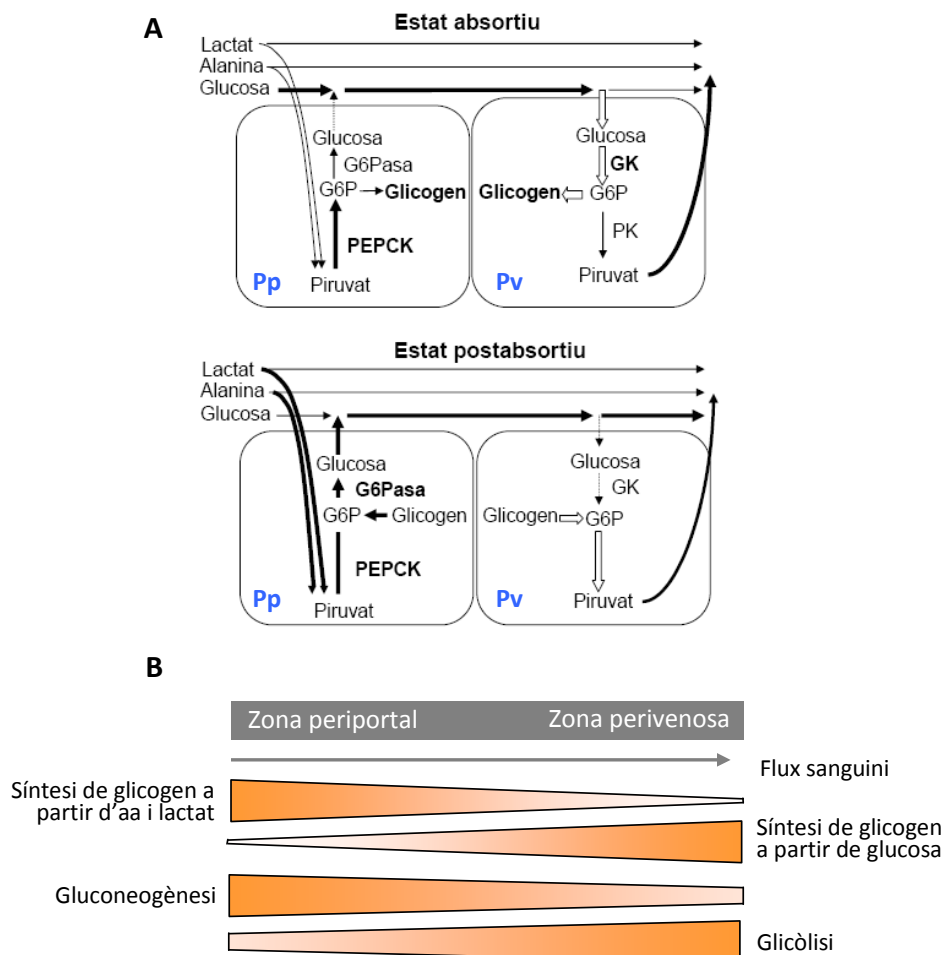


Figura 7. Diagrames de l'heterogeneïtat zonal del metabolisme de glúcids al fetge. On Pp i Pv representen els hepatòcits periportals i perivenosos, respectivament. G6P és glucosa-6 fosfat, G6Pasa és glucosa-6-fosfatasa, PK és piruvat cinasa i GK, glucocinasa.

B.3. Zonació del metabolisme lipídic

El fetge també té un paper central en el metabolisme lipídic. Sintetiza triglicèrids a partir d'àcids grassos i glicerol, i els allibera al torrent sanguini en forma de VLDL (*very-low density lipoproteins*). Els àcids grassos poden provenir tant dels triglicèrids de la dieta o del teixit adipós, com ésser sintetitzats *de novo* al fetge a partir d'acetil-CoA el qual al seu torn pot ésser format a partir de glucosa, lactat, aminoàcids o etanol. A més a més, el fetge pot convertir els àcids grassos en cossos cetònics, que són substrats energètics importants per molts teixits, com el cervell, en situacions de privació energètica. Finalment, el fetge és el principal lloc de síntesi i secreció de colesterol.

A diferència del metabolisme de glúcids i de proteïnes, la zonació del metabolisme lipídic és controvertida i els resultats obtinguts indiquen que potser és menys zonal. Una possible explicació d'aquest fet seria que les vies d'oxidació i de síntesi d'àcids grassos estan localitzades en diferents compartiments cel·lulars (mitochondri, citosòl, respectivament). Aquesta compartimentalització intracel·lular, combinada amb la regulació al·lostèrica eficient que exerceix el metabòlit malonil-CoA a ambdues vies, faria que no sigui necessària una separació dels dos processos en cèl·lules diferents.

- **Lipogènesi:** Teòricament la lipogènesi hauria d'estar situada a la regió on té lloc la glicòlisi, la qual en proporciona el substrat (Acetil-CoA), per tant a la regió perivenosa. Estudis de microdissecció del fetge i de cultiu primari d'hepatòcits periportals i perivenosos han demostrat que la zona perivenosa presenta una major activitat dels enzims lipogènics: ATP citrat liasa, acetil-CoA carboxilasa (ACC) i àcid gras sintasa (FAS) [47, 62]; també dels enzims que generen el NADPH requerit per a la síntesi d'àcids grassos: glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, 6-fosfogluconat deshidrogenasa, enzim màlic i isocitrat deshidrogenasa (Taula 1) [47]. En aquesta línia, Guzman *et al* van demostrar una major taxa de síntesi d'àcids grassos en hepatòcits perivenosos aïllats [61]. Ara bé, la distribució perivenosa de la lipogènesi no es compleix en totes les situacions nutricionals: Guzman *et al* van demostrar un predomini de l'activitat ACC als hepatòcits perivenosos en situació d'alimentació i de re-alimentació, però no en situacions de dejuni o d'exposició a baixes temperatures [62].

A més existeixen tot un seguit d'estudis en què es qüestiona que la lipogènesi sigui perivenosa. La tècnica del doble pols amb digitonina ha demostrat major activitat ACC i major síntesi d'àcids grassos a la zona periportal [90]. I, en contra del que posava de manifest Guzman *et al*, existeixen dos treballs en què es mostra que la zonació perivenosa de l'ACC i d'altres enzims lipogènics, així com enzims productors de NADPH (glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, enzim màlic, etc), només té lloc en situacions de dejuni [60, 91]. En alimentació, detecten els enzims lipogènics a tot l'acinus hepàtic.

Pel què fa a la inducció de la via lipogènica, la hormona T_3 n'estimula l'activitat a la zona perivenosa [60], on hi ha un elevat nombre de receptors d'aquesta hormona [76]. En canvi, una dieta rica en

glúcids activa la lipogènesi a tot l'acinus hepàtic [76]. Per tant, la proporció d'hepatòcits de l'acinus que siguin lipogènics dependrà de la disponibilitat de nutrients així com dels senyals hormonals.

S'ha de considerar que l'ús d'hepatòcits periportals i perivenosos aïllats per a l'estudi de la zonació metabòlica pot no reflectir fidelment el que passa *in vivo*. El temps de manipulació dels hepatòcits així com la realització de les determinacions experimentals poden produir canvis en els fluxes metabòlics. Aquest problema pot ésser important en el cas de la síntesi *de novo* d'àcids grassos, la qual depèn molt de les condicions d'aïllament i d'incubació.

- **Formació i secreció de VLDL:** les partícules de VLDL es formen al reticle endoplasmàtic dels hepatòcits en un procés que depèn de: a) la disponibilitat cel·lular de lípids (triglicèrids, fosfolípids, colesterol i ésters de colesterol); b) la disponibilitat de l'apolipoproteïna B (apoB), la qual està sintetitzada en excés; c) l'ensamblament correcte de les VLDL que està controlat per la proteïna MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*).

Pel què fa a la zonació dels elements necessaris per a la formació de VLDL, existeixen estudis que demostren que els hepatòcits perivenosos tenen una major capacitat d'esterificació dels àcids grassos en TAG i VLDL [61]; així com els estudis esmentats en l'apartat anterior que mostren una major capacitat lipogènica a la zona perivenosa. En canvi, l'expressió de l'apolipoproteïna B malgrat ésser present a tot l'acinus hepàtic predomina a la zona periportal [58]. Finalment, no s'ha detectat zonació en l'expressió de la MTP [45].

Ara bé, pel què fa a la secreció de VLDL, la majoria d'estudis realitzats coincideixen en descriure que tots les hepatòcits de l'acinus tenen capacitats similars de secreció [45, 61]. Per tant, no es pot circumscriure la secreció de VLDL en una zona concreta del fetge. Només determinades circumstàncies nutritives i de toxicitat poden afectar-ne el patró de secreció [45].

- **Oxidació d'àcids grassos:** Pel què fa a l'oxidació mitocondrial dels àcids grassos, anomenada β -oxidació, se n'han detectat taxes elevades a la zona periportal, tal i com evidencien també l'elevada activitat de l'enzim CPT-1 (*carnitine palmitoyltransferase 1*), així com la menor sensibilitat d'aquest enzim a la inhibició per malonil-CoA a la zona periportal [61]. Estudis més recents a nivell d'expressió gènica també han demostrat una major expressió de fosfatidil fosfatasa i de apolipoproteïna C2 (activador de la lipoproteïna lipasa) a la zona periportal [50], i també una major expressió del factor de transcripció PPAR- α el qual acostuma a estar vinculat a altes taxes de catabolització d'àcids grassos i metabolisme peroxisomal [66]. Per altra banda, el predomini de la β -oxidació a la zona periportal també encaixaria amb la major capacitat oxidativa que s'hi detecta. Ara bé, la zonació majoritàriament periportal de la β -oxidació pot canviar en determinades circumstàncies fisiològiques de l'animal [62]. Per altra banda, l'enzim 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (implicat en la β -oxidació) presenta una distribució homogènia a tot l'acinus [57, 65].

Els àcids grassos també poden ésser oxidats als peroxisomes i sembla que l'oxidació peroxisomal és predominant a la zona perivenosa del fetge, independentment de l'estat fisiològic de l'individu [62].

- **Cetogènesi:** La major activitat de la β -hidroxibutirat deshidrogenasa a la zona perivenosa, demostrada per estudis de microdissecció i d'histoquímica [47], suggereixen però no proven que la zona eferent de l'acinus tingui una major capacitat per a la cetogènesi. No ho proven perquè l'enzim β -hidroxibutirat deshidrogenasa és un enzim reversible, que pot funcionar en les dues direccions. (Seria més útil poder avaluar la HMG-CoA sintetasa). En canvi, el glucagó activa la cetogènesi a les cèl·lules periportals en major grau que a les perivenoses [57].

- **Metabolisme del colesterol:** L'enzim clau per a la síntesi del colesterol, la hidroximetilglutaril-CoA reductasa, està localitzat en una petita proporció dels hepatòcits periportals que representa un 20 % del total dels hepatòcits [47]. L'ATP citrat liasa, la qual proporciona acetil-CoA per a la síntesi de colesterol, també presenta localització periportal en alguns treballs [50, 59]. No obstant existeixen estudis que troben més activitat ATP citrat liasa a la zona perivenosa [47]. Aquest enzim proporciona acetil-CoA el qual podria anar destinat a la síntesi d'àcids grassos a la zona perivenosa i a la síntesi de colesterol a la zona periportal. A la zona periportal, l'acetil-CoA per a la síntesi del colesterol prové majoritàriament de l'oxidació dels àcids grassos.

L'eliminació de colesterol a l'organisme només té lloc al fetge on és convertit en sals biliars. Un dels enzims clau en aquesta conversió és la colesterol-7- α -hidroxilasa, o CYP7A1, la qual es troba majoritàriament a la regió perivenosa [50 Herrema, 2010 #521, 63, 64].

La localització oposada de la síntesi de colesterol i de la formació d'àcids biliars proporciona un mecanisme d'interregulació d'aquests processos metabòlics.

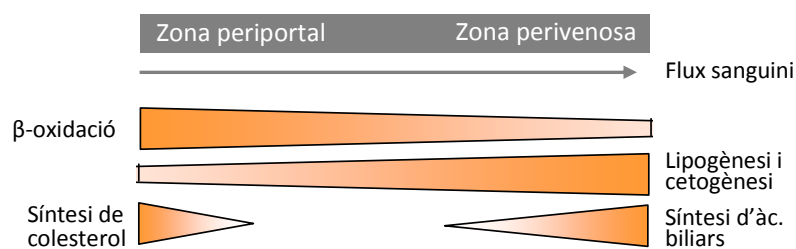


Figura 8. Representació esquemàtica de la zonació del metabolisme lipídic al fetge.

B.4. Metabolisme d'aminoàcids i detoxificació de l'amoni

Els aminoàcids s'usen al fetge com a font energètica, per a la gluconeogènesi i la cetogènesi, així com per a la síntesi proteica i secreció. Les aminotransferases involucrades en la degradació d'aminoàcids són predominants a la zona periportal (Taula 1), on té lloc la gluconeogènesi [47, 50, 80]. El

catabolisme d'aminoàcids succeeix al fetge, però també al ronyó i a l'intestí, i provoca la generació d'amoni. Un augment d'amoni en sang podria tenir conseqüències sobre l'equilibri àcid-base a més de provocar toxicitat en òrgans com el cervell. Per tant, és imprescindible per a l'organisme tenir mecanismes de detoxificació de l'amoni, com són la formació de glutamina i la síntesi d'urea.

La sang portal proporciona grans quantitats de glutamina i d'amoni al fetge. Les cèl·lules periportals capten part d'aquesta glutamina i la major part de l'amoni, perquè estan equipades amb l'enzim glutaminasa i amb els enzims del cicle de la urea (ornitina transcarbamilasa, argininosuccinat sintetasa, argininosuccinat liasa i arginasa) (Taula 1). Com que la síntesi d'urea depèn de la pressió d'oxigen, la taxa d'ureagènesi és lògic que sigui major a la zona periportal.

L'amoni que no és captat a la zona periportal és convertit en glutamina a la regió perivenosa gràcies a l'enzim glutamina sintetasa; concretament, s'ha detectat la presència d'aquest enzim en una estreta capa de cèl·lules (1-3 hepatòcits) al voltant de la vena central de l'acinus (Taula 1). En concordància, els transportadors d'amoni i glutamat (substrats per a la glutamina sintetasa) també presenten una localització preferentment perivenosa [50]. Es creu que una altra font de glutamat a les cèl·lules perivenoses que contenen la glutamina sintetasa seria via la ornitina aminotransferasa, la qual també s'expressa exclusivament en aquestes cèl·lules (Taula 1).

És important destacar la zonació estricta que s'observa en la detoxificació de l'amoni: la glutaminasa i els enzims clau en la síntesi d'urea són elevats a les zones periportals i intermèdies de l'acins hepàtic i absents a l'estreta regió propera a la vena central on s'expressa la glutamina sintetasa; per la seva banda, la glutamina sintetasa té una localització recíproca, és a dir, només als hepatòcits perivenosos més propers a la vena central. Aquesta separació de la glutaminasa i de la glutamina sintetasa permet al fetge eliminar l'excés de glutamina quan és necessari i alhora permet alliberar glutamina quan és requerida per als altres teixits. El mecanisme que té el fetge per modular el balanç d'utilització o síntesi de glutamina és mitjançant la modificació de la taxa d'utilització de la glutamina, ja que la taxa de síntesi és pràcticament constant [73].

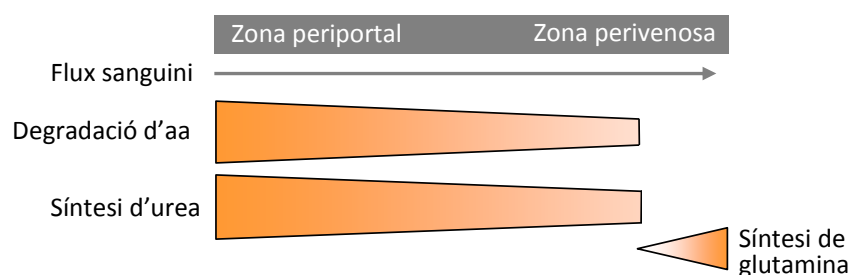


Figura 9. Representació esquemàtica de la zonació del metabolisme d'aminoàcids i la detoxificació d'amoni.

B.5. Metabolisme de xenobiòtics i metabolisme protector

El fetge és el major lloc on els xenobiòtics són convertits en productes excretables a través d'un procés que consta de 2 passos: 1) oxigenació, hidroxilació o reducció per part del sistema del citocrom P450; 2) conjugació amb àcid glucurònic, àcid sulfúric o glutatió. A la zona perivenosa, on predomina el reticle endoplasmàtic llis, també s'ha detectat major presència dels isoenzims del citocrom P450, i de la UDP-glucuronosiltransferasa. En canvi, la conjugació amb àcid sulfúric predomina a la zona periportal [46, 80]. La metabolització de xenobiòtics independentment del P450, com per exemple la conversió de l'etanol per l'alcohol deshidrogenasa, també predomina a la zona perivenosa.

La metabolització de determinats xenobiòtics (per exemple, el bromobenzè o el tetraclorur de carboni) per part del citocrom P450 pot donar lloc a la formació de tòxics electròfils els quals potencien l'aparició d'espècies reactives d'oxigen. Com que els isoenzims del citocrom P450 predominen a la zona perivenosa, és on es formen majoritàriament aquests metabòlits tòxics. No obstant, la capacitat de detoxificació (via glutatió i glutatió peroxidasa) és superior a la zona periportal. Per tant, els hepatòcits perivenosos estan menys protegits contra els efectes tòxics dels electròfils; la qual cosa pot explicar probablement la necrosi perivenosa que provoquen determinades hepatotoxines [46, 80]. La importància fisiopatològica de la heterogeneïtat hepàtica s'il·lustra per l'observació que hi ha sensibilitat zonal a danys causats per hipòxia o hepatotoxines.

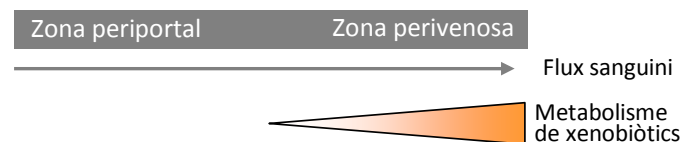


Figura 10. Representació esquemàtica de la zonació del metabolisme de xenobiòtics.

C. Zonació estàtica versus zonació dinàmica

Si analitzem la zonació de les diferents vies metabòliques, ens adonarem que podem descriure dos patrons diferents d'expressió gènica:

- Per una banda, existeixen gens que s'expressen establement en determinats hepatòcits de l'acinus hepàtic, ja sigui a la zona perivenosa o a la periportal, independentment de l'estat metabòlic o hormonal. En aquest cas, parlem de **zonació estàtica**. El paradigma de zonació estàtica és el metabolisme de l'amoni i, concretament, els enzims glutamina sintetasa i carbamoil-fosfat sintetasa (CPS) en són els exemples més ben coneguts. La glutamina sintetasa s'expressa establement i en grans nivells en 1-3 capes d'hepatòcits al voltant de la vena central, mentre que la CPS es troba a la

resta d'hepatòcits de l'acinus que no expressen la glutamina sintetasa. El nombre d'hepatòcits que els expressen és difícilment afectat per estímuls externs.

- Determinats gens tenen un patró d'expressió més dinàmic (induïble) en forma de gradient al llarg de l'eix porto-central de l'acinus; així, tots els hepatòcits de l'acinus poden expressar un determinat gen, però en diferent grau. A més, l'expressió gradual pot expandir-se o estretar-se al llarg de l'eix porto-central en funció de l'estat metabòlic, de l'hora del dia o altres condicions fisiopatològiques. Aquesta plasticitat en l'expressió gènica i/o en la funció hepàtica es coneix amb el nom de **zonació dinàmica**. La plasticitat ha estat observada per un gran nombre de vies, com el metabolisme de glúcids i de lípids.

Per exemple, un dejuni prolongat augmenta la capacitat gluconeogènica del fetge: la PEPCK i la glucosa-6-fosfatasa (típicament situades a la zona periportal) augmenten a la zona periportal però també a la zona perivenosa de l'acinus. En realimentar els animals, es restableix la zonació gluconeogènica periportal i incrementa l'expressió de gens glicolítics i lipogènics sobretot a la zona perivenosa. També s'observa un increment de PEPCK a la zona perivenosa en casos de diabetis [92]. La composició de la dieta també pot afectar l'heterogeneïtat metabòlica al llarg de l'acinus: una dieta rica en greix i proteïna augmenta l'activitat PEPCK en major grau a la zona perivenosa que a la periportal [93], i el mateix s'esdevé amb una dieta rica en sacarosa [94].

Els enzims que participen en el metabolisme de xenobiòtics, incloent diverses isoformes de la citocrom p450 (CYPs), presenten un comportament d'expressió dinàmic però més suau que el del metabolisme glúcidic. En situacions normals, l'expressió de la majoria de CYPs està restringida a una porció petita d'hepatòcits situats al voltant de la vena central, mentre que l'expressió es pot estendre gradualment en direcció a les zones periportals quan els animals estan en contacte amb inductors d'aquests enzims com, per exemple, determinats barbitúrics [95].

L'avantatge de la zonació dinàmica és que permet flexibilitzar l'expressió d'enzims clau per adaptar el metabolisme hepàtic a les diferents situacions fisiològiques i patològiques.

D. Causes de la zonació hepàtica

Des de l'aparició del concepte de zonació hepàtica, han existit nombroses teories i hipòtesis per explicar-ne les causes. Poder elucidar els mecanismes responsables de la inducció i del manteniment de l'heterogeneïtat dels hepatòcits és, doncs, tot un repte en l'hepatologia experimental. En principi, és evident que la posició de l'hepatòcit dins de l'acinus és clau alhora de determinar el seu patró d'expressió i la seva funcionalitat. Així ho indica un estudi en què es transplanten hepatòcits al fetge i aquests hepatòcits transplantats expressaran gens diferents segons si estan a la zona perivenosa o a

la periportal [96]. Per tant, l'expressió gènica específica de posició deu reflectir la conseqüència d'interaccions complexes entre factors de transcripció cel·lulars, senyals de cèl·lules adjacents, components de la matriu extracel·lular, hormones, metabòlits, oxigen, etc. En els últims anys han aparegut noves evidències *in vivo* sobre la implicació de factors morfogenètics específics (oxigen, factors de creixement, Wnt) i d'efectors cel·lulars (β -catenina, Ras) que suggereixen que la zonació hepàtica és un fenomen complex que no pot ésser conduït per un únic efector específic [53, 97].

D'entrada es podria establir que la zonació dinàmica i la zonació estàtica estan regulades de forma diferent. Per una banda, la zonació dinàmica dependria dels gradients de substrats, oxigen, hormones, metabòlits, etc., que s'estableixen al llarg de l'eix porto-central durant el pas de la sang a través del sinusoid. En canvi, la zonació estàtica vindria donada principalment per senyals de proximitat cèl·lula-cèl·lula, que en els últims anys s'ha concretat en la via de senyalització de Wnt/Wingless .

A continuació, s'enumeren les principals variables que poden intervenir en l'orquestració del complex fenomen de la zonació:

1. Gradient de pressió parcial d'oxigen entre la zona periportal i la zona perivenosa. Durant el pas de la sang des de la zona periportal fins a la zona perivenosa del sinusoid, la concentració d'oxigen lliure dissolt en sang disminueix un 50%. En experiments realitzats en hepatòcits cultivats sota una pressió parcial d'oxigen periportal (13 % v/v) o perivenosa (6 % v/v), s'ha demostrat que diversos gens del metabolisme de glúcids poden ésser regulats per l'oxigen [98]. Així, tant els nivells de mRNA com d'activitat de l'enzim gluconeogènic PEPCCK foren induïts fortament per glucagó quan els hepatòcits estaven sotmesos a pressió d'oxigen periportal [99]. Recíprocament, la inducibilitat de l'enzim glicolític GK per insulina fou més elevada en condicions de pressió d'oxigen perivenosa [87, 98].

A més de regular la zonació hepàtica a nivell transcripcional, també pot fer-ho a nivell post-transcripcional ja que per exemple, s'ha demostrat que per l'acció de l'oxigen el receptor d'insulina es troba majoritàriament a la zona perivenosa de l'acinus mentre que el gen del receptor de la insulina s'expressa homogèniament a tot el fetge [77, 78].

El mecanisme de regulació gènica per oxigen que s'ha proposat és a través de H_2O_2 com a segon missatger. H_2O_2 és una molècula no carregada que pot difondre lliurement i participar en reaccions de transferència d'electrons. Mitjançant la reacció de Fenton en presència de Fe^{2+} , l'oxigen pot ésser convertit no enzimàticament en anions hidroxil i radicals hidroxil ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\cdot$). Aquesta reacció és potencialment de gran importància en la cascada de senyalització de l'oxigen ja que els radicals OH^\cdot són altament reactius i poden interferir immediatament al seu lloc de producció amb factors de transcripció. S'ha demostrat que la transcripció dels gens de la PEPCCK i de la GK són

modulats per la formació de OH[·] via la reacció de Fenton [98]. En el cas del gen de la PEPCK, s'han detectat elements de resposta a normòxia en el seu promotor on teòricament s'uniria el factor de transcripció activat pel senyal d'oxigen. També tenen elements de resposta a oxigen els gens de la tirosina aminotransferasa i la serina deshidratasa, típicament periportals [98].

2. Gradient de substrats i metabòlits entre la zona periportal i la zona perivenosa. S'ha descrit que la concentració d'amoni i d'àcids biliars entre la zona periportal i la perivenosa disminueix de l'ordre de 6 vegades, la qual cosa pot afectar la regulació dels enzims claus en la seva metabolització. La zonació és particularment marcada per a compostos que arriben al fetge a baixes concentracions i que són captats i generats al fetge, com per exemple, el glicerol o l'acetat. En canvi, els gradients de concentració per a la majoria de substrats, com glucosa, lactat, aminoàcids i àcids grassos lliures s'estima que són massa lleugers com per jugar un paper important en la zonació metabòlica [46, 47].

3. Gradients d'hormones entre la zona periportal i la zona perivenosa: Moltes hormones són captades i degradades pels hepatòcits al llarg del seu pas pel fetge, per tant són candidats plausibles com a reguladors zonals. S'han descrit gradients de captació per a la insulina, el glucagó, l'adrenalina, la corticoesterona i l'hormona tiroïdea T₄. S'espera un gradient invers per a la hormona tiroïdea T₃, la qual és sintetitzada a partir de T₄ als hepatòcits [46, 47]. El pendent del gradient de captació, el qual determinarà el poder dels efectes zonals d'aquestes molècules, fluctua amb l'estat nutricional i fisiològic de l'organisme. Quan es capten dues hormones amb accions antagonistes, el pendent del gradient de captació és crucial. Per exemple, el glucagó es capta més a la zona periportal que a la perivenosa, de manera que el quocient glucagó/insulina és decreixent al llarg de l'acinus i, per tant, pot afectar la zonació del metabolisme de glúcids [100].

4. Diferent inervació de la zona periportal i de la zona perivenosa: Els nervis simpàtics i parasimpàtics entren al fetge com a ramificacions al voltant de l'artèria hepàtica i la vena porta; per tant afectarien la regulació gènica de la zona periportal en major grau [46, 82].

5. Diferent població de cèl·lules no parenquimals a la zona periportal i a la zona perivenosa. Les cèl·lules de Ito, Kupffer, i de Pit predominen a la zona periportal. Potser poden enviar senyals als hepatòcits circumdants que n'afectin l'expressió gènica o en modulin l'activitat proteïca [82].

6. Interaccions cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu extracel·lular [101, 102].

7. Diferent estat de diferenciació dels hepatòcits al llarg de l'acinus. Aquesta teoria parteix de les evidències de l'existència de cèl·lules mare a les zones periportals. L'estat de desenvolupament de les cèl·lules al llarg de l'eix porto-central dictaria l'expressió gènica, amb hepatòcits menys diferenciats a la zona periportal i hepatòcits madurs i especialitzats a la zona perivenosa. No obstant, diverses

dades experimentals van en contra d'aquests models de desenvolupament com a responsables de la zonació hepàtica [96, 103].

8. Activació de les vies de senyalització de β -catenina i de Ras/MAPK. Aquesta hipòtesi deriva dels descobriments obtinguts en l'estudi del patró d'expressió gènica de tumors hepàtics de ratolins: aquells tumors causats per mutacions activadores en el gen de la β -catenina presentaven un patró d'expressió gènica que es corresponia amb el patró dels hepatòcits perivenosos; mentre que els tumors que presentaven una activació del gen *Ha-ras* tenien un patró d'expressió gènica típicament periportal [97, 104]. Aquesta troballa suggeria que Ras i β -catenina podien ésser vies senyalitzadores de la zonació hepàtica en el fetge sa.

Si ens centrem en la **β -catenina**, és part de la via canònica de transducció del senyal iniciat per la unió de les glicoproteïnes Wnt/Wingless als receptors transmembrana de la família Frizzled. La β -catenina es troba al citoplasma cel·lular o associada al domini intracel·lular de la E-cadherina, que juga un paper important en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula perquè és un component de les unions adherents i del citoesquelet d'actina. Els nivells de β -catenina a la cèl·lula acostumen a ésser baixos perquè estan regulats negativament per un complex multiproteïc que conté diverses proteïnes inclosa la GSK-3 β , l'axina i la proteïna APC (*adenomatous polyposis coli protein*). Concretament, GSK-3 β fosforila la β -catenina i fa que sigui dirigida cap a la degradació dependent de proteasoma. Quan Wnt s'uneix al seu receptor de membrana, s'indueix el trencament del complex multiproteïc GSK-3 β -Axina-APC i, en conseqüència, s'evita la degradació de la β -catenina. Té lloc, doncs, una augment dels nivells de β -catenina citosòlica que serà lliure per entrar al nucli, on interacciona amb factors de transcripció de la família LEF1/TCF per activar o inhibir l'expressió de determinats gens. Per tant, la senyalització a través de la via de Wnt és molt dependent dels nivells de β -catenina que s'assoleixin dins de la cèl·lula. Els gens diana de la beta-catenina són típicament perivenosos: la glutamina sintetasa, el transportador-1 de glutamat, l'ornitina aminotransferasa (Oat), la quimiotaxina leucocitària 2 (Lect2), l'axina, la RNAsa 4... malgrat que no tots ells s'expressen uniformament a la zona perivenosa sinó que tenen una localització distal o proximal en funció dels nivells de β -catenina que requereixen per a la seva expressió (Figura 11, D-I).

Per entendre bé el mecanisme pel qual la β -catenina induïx zonació hepàtica, cal considerar la seva localització al llarg de l'acinus. En realitzar estudis d'immunohistoquímica per a la β -catenina no fosforilada (activa) es va detectar senyal únicament a la zona perivenosa del fetge (Figura 11, A-B). En canvi, si s'emprava l'anticòs contra APC es detectava senyal només al compartiment periportal (Figura 11, C). Aquesta distribució complementària entre la β -catenina activa i l'APC suggereix que la via de la β -catenina pot afectar oposadament el programa genètic d'aquests dos dominis (perivenós i periportal).

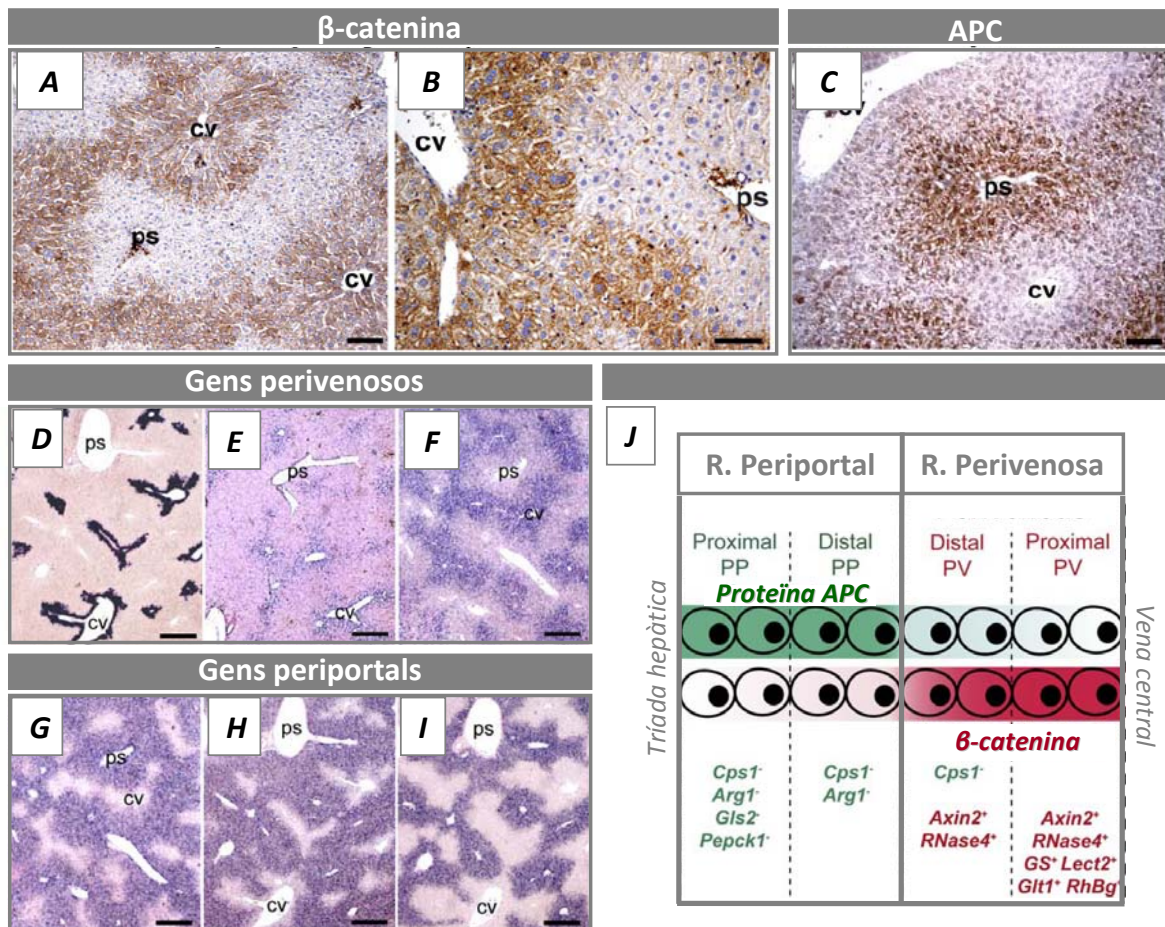


Figura 11. Regulació de la zonació hepàtica per la senyalització de β -catenina. (A i B) Mostren la immunolocalització de la β -catenina no fosforilada (activa) en seccions de fetge de ratolí i permeten observar-ne la localització majoritàriament citoplasmàtica exclusivament als hepatòcits circumdants a la vena central (cv). (C) El senyal obtingut amb l'anticòs contra APC és clarament complementari al de la β -catenina, és a dir, periportal (ps = portal space). (D-I) Hibridació *in situ* de seccions de fetge de ratolí per avaluar l'avast de l'expressió de gens marcadors zonals: (D) Glutamina sintetasa, (E) Axina 2, (F) RNasa 4, (G) Arginasa, (H) Carbamoil fosfat sintetasa 1 i (I) Glutaminasa 1. L'escala és de 200 μ m per a la figura A i C, de 100 μ m per a la figura B i de 500 μ m per a les figures D-I. (J) Diagrama de l'organització de la zonació mitjançada per β -catenina a l'acinus: en verd es mostra la zona periportal, sense senyalització de β -catenina; en vermell es mostra la zona perivenosa activada per la senyalització de β -catenina. Els gens activats per la via de β -catenina estan marcats amb "+", i els inhibits per "-". (Figura adaptada del treball de Benhamouche *et al*, *Developmental Cell*, 2006 [53]).

Existeixen diversos models animals que corroboren la implicació de la via de senyalització dependent de β -catenina per a la inducció del patró d'expressió perivenós. Per una banda, l'activació de la β -catenina a tot el fetge indueix l'expressió gènica típicament perivenosa al llarg de l'acinus i inhibeix l'expressió dels gens típicament periportals (PEPCK, CPS, etc.) [105]. S'observava exactament el mateix fenotip de pèrdua d'expressió de gens periportals i extensió dels gens perivenosos al llarg de l'acinus en un ratolí genosuprimit per APC al fetge (recordem que APC està involucrat en la degradació de la β -catenina, per tant, la inactivació d'APC resulta en l'acumulació de β -catenina) [53,

71]. En canvi, en models animals deficients en el senyal de β -catenina al fetge es perdia l'expressió dels marcadors perivenosos i l'expressió dels gens periportals s'estenia al llarg de l'acinus [55, 71, 106]. En conclusió, l'acumulació de β -catenina, imitant la via de senyalització per Wnt, és necessària per a la inducció del fenotip perivenós mentre que la inhibició de la senyalització de Wnt és essencial per al manteniment del fenotip periportal.

En aquest punt, apareixen dues preguntes en relació a la regulació per Wnt del fenotip zonal. En primer lloc, quins són els Wnt produïts al fetge [107]. En segon lloc quina és la font del senyal Wnt responsable de l'activació de la β -catenina a la zona perivenosa. Existeixen evidències que els Wnts poden originar-se en les cèl·lules endotelials de les venes centrals: co-cultius d'hepatòcits amb cèl·lules endotelials han demostrat que s'indueix la glutamina sintetasa (marcador perivenós) en hepatòcits periportals [108, 109]; també s'ha evidenciat que la interacció directa dels hepatòcits amb les venes centrals pot induir l'expressió de la glutamina sintetasa [110].

La senyalització Wnt/ β -catenina permet justificar la zonació estàtica del metabolisme de l'amoni [97], amb una distribució recíproca dels components del cicle de la urea a la zona periportal (Arginasa1, Glutaminasa, Carbamoil fosfat sintetasa 1), i de la formació de glutamina a la zona perivenosa (Glutamina sintetasa, Ornitina aminotransferasa, Transportador 1 de glutamat). En concordància, els ratolins *knock-out* per APC (que tenen un fetge amb patró d'expressió perivenós) presentaven nivells elevats de glutamina i d'amoni al fetge i a la sang, mentre que la urèmia disminuïa [53]. Recentment, també s'ha demostrat que la via Wnt/ β -catenina també determina la zonació del metabolisme de xenobiòtics (citocroms p-450 i glutatió-s-transferasa [111, 112]).

En resum, la β -catenina juga un paper clau en determinar el fenotip perivenós dels hepatòcits. Però quina és la natura i els senyals de transducció que dicten el fenotip periportal? Replantem el fil de l'inici d'aquest apartat, sembla que l'activació de la via de senyalització **Ras/MAPK** hi està implicada [97]. De fet, Braeuning *et al* van emprar ratolins transgènics que expressaven una forma oncogènica de H-ras i també cultius cel·lulars a diferents concentracions de sèrum (que conté components indeterminats que activen la via de Ras) per demostrar que l'activació de la via de Ras/MAPK causava la supressió de l'expressió de gens perivenosos i induïa l'expressió de gens periportals, a través de la inhibició de la via de la β -catenina [104] [113]. No obstant, no es coneixen encara quines són les molècules, presumptament presents al torrent sanguini, que activarien la via de senyalització de Ras a la zona periportal.

A més de la via de Ras/MAPK, recentment s'han identificat altres elements implicats en el manteniment de l'expressió del patró periportal com són el factor de transcripció HNF-4 α i la proteïna Dicer.

El desenvolupament i manteniment de l'arquitectura i la funció hepàtica està regulat per factors de transcripció típics del fetge, que esdevenen marcadors del teixit. Un d'aquests factors de transcripció és el **HNF-4 α** que s'uneix al promotor del 12% dels gens que s'expressen al fetge adult, i exerceix la seva funció reguladora mitjançant la interacció amb co-activadors o co-repressors. Durant l'organogènesi i en la regeneració del fetge, HNF-4 α dirigeix la diferenciació dels hepatoblasts a hepatòcits i controla la formació del parènquima hepàtic. S'ha descrit que està involucrat en la regulació de gens expressats periportalment (per exemple, enzims gluconeogènics com la PEPCCK-C i la glucosa-6-fosfatasa) i també gens perivenosos (algunes isoformes de la citocrom p-450, la UDP-glucuroniltransferasa, l'apolipoproteïna E i fins i tot la glutamina sintetasa). Curiosament, un model de ratolí transgènic genosuprimit per HNF-4 α al fetge va revelar que aquest factor de transcripció té un paper activador dels gens periportals i inhibidor dels gens perivenosos als hepatòcits periportals [54], perquè els hepatòcits perivenosos mantenen el patró perivenós i els periportals deixaven d'expressar marcadors periportals i s'hi induïen els gens perivenosos. Cal dir que alguns gens que s'expressen normalment a la zona perivenosa, no van variar en el fetge genosuprimit per HNF-4 α , com és el cas de CYP-3A4 i CYP-7A; també alguns gens periportals no van ésser afectats, com és el cas de la carbamoil fosfat sintetasa (CPS). Aquestes dades suggereixen que HNF-4 α no és el determinant principal del gradient porto-central de l'expressió gènica al fetge, però sí que afecta a un subgrup de gens específics dels hepatòcits. De fet, s'ha descobert que HNF-4 α pot interactuar amb el factor de transcripció activat per la via de β -catenina (LEF1/TCF) [70]. Així, segons l'estructura dels promotors i segons l'activitat transcripcional positiva o negativa dels efectors HNF-4 α i LEF1/TCF es poden donar diverses situacions: alguns gens requereixen la unió de LEF1/TCF i HNF-4 α per estar activats (CYP-1A1, Glutamina sintetasa), altres són activats en presència de HNF-4 α i absència de LEF1/TCF (Glutaminasa 2); (per més detalls consultar el treball de Colletti *et al* [70]).

Per la seva banda el **Dicer** és un component essencial per a la biogènesi de microRNAs (miRNA) que converteix els pre-miRNAs en miRNAs madurs. Com que està codificat per un sol locus del genoma, la disrupció del gen Dicer 1 provoca la pèrdua de virtualment tots els miRNAs. Sorprenentment, la pèrdua del Dicer al fetge ocasionà que les proteïnes periportals perdessin la seva zonació i s'estenguessin per tot l'acinus (tal com succeïa amb la pèrdua de la β -catenina), però no s'afectava el patró d'expressió de les proteïnes perivenoses [55]. Per tant, el Dicer regula algun/s factor/s (miRNAs) que suprimeixen l'expressió de les proteïnes periportals a la zona perivenosa, en algun punt per sota de l'activació de la β -catenina (Figura 12).

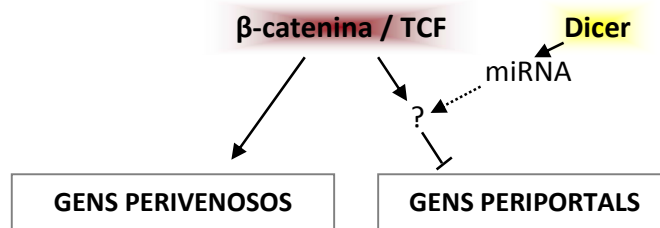


Figura 12. Model de la regulació de l'expressió gènica zonal. La via de senyalització de la β -catenina, mitjançant el factor de transcripció LEF1/TCF, transactiva els gens perivenosos alhora que reprimeix l'expressió dels gens periportals. El Dicer i miRNAs són essencials per a la repressió dels gens periportals, però no són regulats directament per β -catenina (Adaptada de Sekine *et al* 2009 [55]).

E. Implicacions de la zonació hepàtica

Malgrat l'antiguitat del concepte de zonació hepàtica, ha estat difícil poder incloure la variable de la zonació en els diferents estudis que s'han realitzat al fetge, sobretot en l'allau de models d'animals transgènics que s'han generat en les últimes dècades. En la majoria dels casos s'han emprat promotors ectòpics per dirigir l'expressió del transgen, sense garantir, doncs, que el transgen seguís el patró d'expressió fisiològic. En conseqüència, en molts casos ha estat difícil interpretar els resultats d'estudis de fluxes i metabòlica en el fetge sencer [114, 115]; així com també s'han obtingut divergències en els fenotips dels animals transgènics. Vista la importància de la zonació, pot ser que molts estudis d'animals transgènics en fetge tinguin fenotips que no s'ajustin a la realitat.

Un exemple de divergència de fenotips entre animals transgènics seria l'observada entre el model de sobreexpressió de GK sota el control del promotor de la PEPCK-C i el model obtingut per Hariharan *et al*, en què el transgen està controlat pel promotor de l'apolipoproteïna A1 [116-118]. Malgrat que la sobreexpressió de GK provoca una disminució de la glicèmia i de la insulinèmia en els dos casos, hi ha canvis pel què fa als nivells de lactat sèrics i sobretot en la progressió dels animals: en el cas del grup de Ferre *et al*, acaben desenvolupant esteatosi hepàtica, resistència a insulina i major increment de pes; mentre que els ratolins del grup de Hariharan *et al* presenten una disminució del pes corporal amb l'edat. En canvi, el fenotip esmentat obtingut per la sobreexpressió GK majoritàriament a la zona periportal (sota el control del promotor de la PEPCK-C) s'assimila, en alguns aspectes, a l'observat en un model de gensupressió del gen de la PEPCK-C al fetge [119]. El fet que la GK es sobreexpressi a la zona periportal provocaria una disminució de la gluconeogènesi en els fetges dels ratolins transgènics, tal i com succeeix en el *knock-out* hepàtic de PEPCK-C. La conseqüència en ambdós casos és una desregulació del metabolisme hepàtic que a la llarga condueix a l'acumulació zonal de lípids al fetge.

3. GLUCOCINASA, ENZIM CLAU EN L'HOMÈOSTASI DE GLUCOSA

Com s'ha esmentat al capítol 1 d'aquest treball, la regulació fisiològica de la homeòstasi de glucosa implica les interaccions entre múltiples teixits, mitjançades per diverses hormones, pel sistema nerviós i també per canvis en les concentracions de nutrients específics. La majoria de cèl·lules i teixits involucrats en aquest sistema de control tenen en comú que expressen l'enzim glucocinasa (GK); concretament, s'ha detectat mRNA i proteïna de la GK als hepatòcits, a les cèl·lules α i cèl·lules β del pàncrees, a les cèl·lules L i K entero-endocrines, a cèl·lules de la glàndula pituïtària i en neurones de diversos nuclis hipotalàmics [120-122]. S'hipotetitzava que el control de l'homeòstasi de glucosa requereix el funcionament intacte de tota aquesta xarxa formada per cèl·lules que expressen GK.

La GK és un enzim que catalitza la fosforilació de la glucosa al sisè carboni per obtenir glucosa-6-fosfat. Fou descrita per primera vegada el 1964 al fetge, i el 1968 a la cèl·lula β pancreàtica. Durant les dècades següents, una recerca intensa sobre la bioquímica, la fisiologia i la biologia molecular de la GK ha conduït a que aquest enzim sigui considerat una peça crítica de la homeòstasi de glucosa. Les fites més importants assolides per arribar al coneixement actual d'aquest enzim són:

- la formulació del concepte de "sensor de glucosa" [123].
- la descoberta que existeix un control de la GK específic de teixit [124, 125]
- el descobriment del lligament genètic entre la GK i una forma de diabetis [126]; així com el descobriment de diverses mutacions de l'enzim que causen hiperglicèmia o hipoglicèmia en humans [127-130].
- la informació obtinguda en models animals en què es sobreexpressava o es genosuprimia la GK [118, 131-135]
- l'elucidació de l'estructura proteïca que va permetre entendre les característiques cinètiques peculiars que presenta la GK [136].
- la descoberta d'un lloc al·lostèric de regulació al qual s'uneixen un grup de fàrmacs anomenats activadors de la GK (GKAs) [136, 137].

A continuació, s'anirà desglossant aquesta informació.

3.1 Estructura i propietats cinètiques de la GK

La glucocinasa (ATP:D-glucosa 6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.1), també coneguda amb el nom de hexocinasa IV o D, és un dels quatre enzims que fosforilen la glucosa detectats en els teixits dels vertebrats [122]. Pertany a la família de les hexocinases, tots els membres de la qual catalitzen la fosforilació d'hexoses amb l'ATP com a cosubstrat per obtenir hexosa-6-fosfat ($\text{RCH}_2\text{OH} + \text{MgATP}^{2-} \rightarrow \text{RCH}_2\text{OPO}_3^{2-} + \text{MgADP}^- + \text{H}^+$). Però la GK té una sèrie de característiques cinètiques i estructurals que la diferencien de la resta d'hexocinases i justifiquen que aquest enzim es localitzi en les cèl·lules que són sensibles a glucosa (Taula 2).

	HEXOCINASES 1-3	GLUCOCINASA (GK)
Pes molecular	100 KDa	50 KDa
Substrats	hexoses	glucosa
S_{0.5} (glucosa)	< 0.5 mM	8 mM
Tipus de cinètica	hiperbòlica	sigmoïdal
Inhibició per producte	sí	No

Taula 2. Propietats cinètiques de la família de les hexocinases

La GK comparteix un alt grau de similitud de seqüència amb algunes hexocinases de 50 KDa que es troben en llevats, i també amb les altres hexocinases de vertebrats (HK 1-3), que són de 100 KDa. Es creu que les hexocinases de 100 KDa han evolucionat per duplicació i fusió d'una hexocinasa de 50 KDa ancestral [138]. Pel que fa a les característiques cinètiques, les hexocinases 1-3 tenen relativament altes afinitats per diferents substrats del tipus hexosa i estan inhibides per concentracions fisiològiques de glucosa-6-fosfat. En contrast, la GK té com a substrat principal la glucosa per a la qual té una afinitat baixa ($S_{0.5} \sim 8$ mM, similar a la concentració de glucosa en sang); no està afectada per les concentracions fisiològiques de glucosa-6-fosfat i la reacció segueix una cinètica sigmoïdal per a la glucosa (cooperativitat $n_H \sim 1.7$) en lloc d'hiperbòlica [138]. Les peculiars propietats cinètiques de la GK són de gran importància a nivell fisiològic, perquè permeten que l'activitat fosforiladora de l'enzim variï d'una forma ultrasensible en funció dels canvis en la concentració sanguínia de glucosa (ja que les cèl·lules en què s'expressa la GK presenten un transport de glucosa a la membrana plasmàtica no limitant), fet que converteix la GK en un element intracel·lular sensor de glucosa (Figura 13).

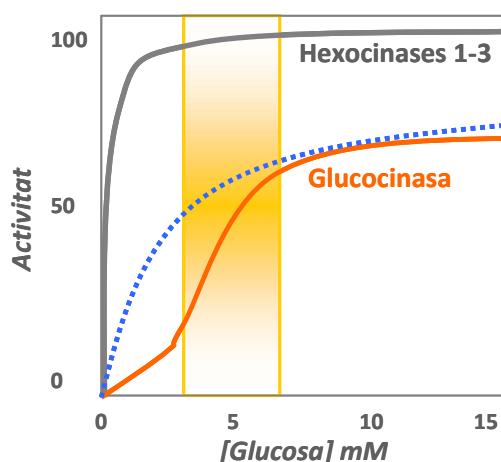


Figura 13. Comparació entre la cinètica hiperbòlica i la sigmoïdal de la família de les hexocinases.

La cinètica sigmoïdal pot ocórrer en enzims que tenen múltiples subunitats o bé diversos llocs actius, però és una propietat rara per a enzims monomèrics amb un sol centre actiu com la GK. La desviació de la cinètica hiperbòlica en enzims monomèrics pot explicar-se en casos d'addició a l'atzar dels substrats, però no és el cas del cycle catalític de la GK, en el qual hi ha una addició ordenada dels substrats en què primer s'uneix la glucosa i en segon lloc l'ATP. En base a les investigacions enzimàtiques inicials, es van proposar dos models per explicar aquesta cooperativitat per a la glucosa: el model mnemònic i el model de transició lenta entre dues conformacions induïda pel lligand. No fou fins el 2004 en què les dades estructurals obtingudes per Kamata *et al* van donar suport explícit al model mnemònic [136].

La GK fou molt difícil de cristal·litzar en comparació a les altres hexocinases perquè té un gran moviment molecular que impedia la formació de cristalls. Kamata *et al* aconseguiren cristal·litzar-la en usar una GK truncada a l'extrem N-terminal (11 o 15 aminoàcids) en dues condicions de cristal·lització: en absència de qualsevol lligand o en presència de glucosa més un activador farmacològic (GKA) [136]. L'estructura global de la proteïna està formada per dos dominis globulars, un de gran i un de petit, connectats per una articulació o regió connectora. En presència de glucosa i de GKA, la GK presenta una conformació anàloga a la de la HK-1 unida a glucosa o a les HK de llevat (Figura 14 A), anomenada **conformació tancada**: els dominis gran i petit estan plegats de manera que entre ells es forma una esclatxa estreta amb el lloc d'unió dels substrats. A diferència de les altres hexocinases, a l'articulació que existeix entre els dos dominis apareix un lloc d'unió pel GKA, considerat un lloc de regulació al·lostèrica de l'enzim (Figura 14 B).

En absència de lligands, la GK existeix en una **forma súper-oberta**, caracteritzada pels dos dominis globulars separats per una esclatxa àmplia que implica la desaparició del centre actiu i també del lloc d'unió de l'activador al·lostèric (Figura 14 B). Els moviments intramoleculars que tenen lloc durant la transició d'una forma a l'altra són substancials (aproximadament 120°) en comparació amb els de la

HK-1, gràcies a què la regió d'articulació entre els dos dominis de la GK permet moviments molt més amplis. S'ha postulat l'existència d'una conformació addicional de GK anomenada forma oberta, intermèdia entre la super-oberta i la tancada, l'estructura de la qual encara no s'ha establert. En comparació amb la forma tancada, la conformació oberta tindria una esqueleta interdominis més ampla sense canvis en la topologia del domini petit. La transició entre la conformació oberta i tancada podria ésser ràpida i fàcilment reversible, en contrast a la reorganització molecular complexa que existeix en la transició entre la forma súper-oberta i oberta. Mitjançant l'ús de la fluorescència del triptòfan, recentment s'ha confirmat que la GK pot adoptar fins a 4 conformacions diferents segons les concentracions de substrats i altres lligands [139].

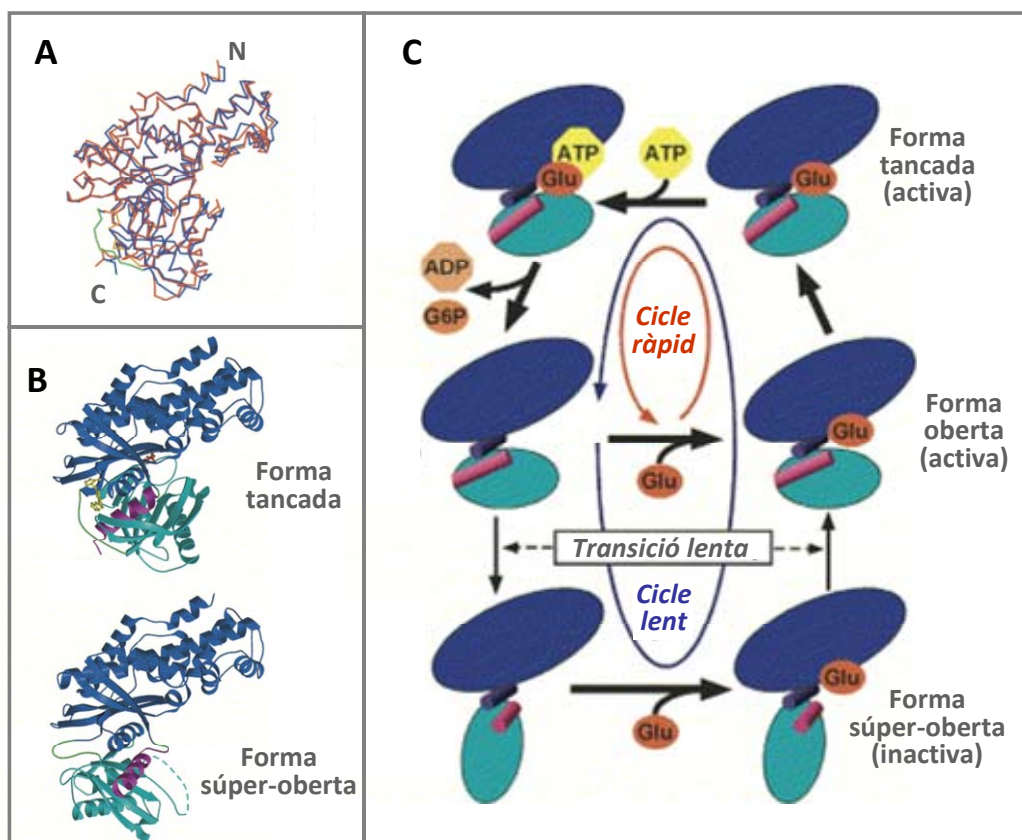


Figura 14. L'estructura proteïca de la GK permet explicar la cinètica sigmoïdal de l'enzim. (A) Es mostra la superposició dels models d'estructura proteïca de la meitat C-terminal de la forma tancada de la hexocinasa 1 (colors verd i taronja), segons el model de Aleshin *et al*, i de la GK en conformació tancada (colors blau i verd). Cal destacar que les estructures de la regió connectora són diferents entre els dos enzims (taronja i verd). **(B)** Representació de l'estructura secundària de la GK en la forma tancada, on es presenta el lloc d'unió de la glucosa (vermell) i de l'activador de GK (groc), i en la forma súper-oberta. Es mostra el domini gran de color blau i el domini petit de color cian. En magenta es representa la regió c-terminal de la GK, la qual s'inclou en el domini petit de la GK en conformació tancada i s'allibera en la forma súper-oberta. **(C)** Model cinètic de la GK: la GK existiria en 3 conformacions i tindria 2 cicles catalítics. La relació entre els dos cicles catalítics és el responsable de la resposta sigmoïdal a la glucosa. (Figura adaptada del treball de Kamata *et al* [136]).

Amb les dades de cinètica i amb les estructures cristal·lines de Kamata, s'ha establert el següent model de cinètic de la GK (Figura 14 C): en absència de glucosa, l'enzim existeix en una forma súper-

oberta estable termodinàmicament i amb baixa afinitat pel substrat. En unir-s'hi la glucosa, té lloc un canvi conformacional lent cap a la forma oberta i a continuació cap a una conformació tancada que uneix l'ATP. Aleshores té lloc el cicle catalític que és molt més ràpid que el canvi conformacional entre la forma súper-oberta i tancada; i, després de l'alliberament dels productes, l'enzim pot relaxar-se cap a la conformació súper-oberta termodinàmicament favorable. Però a altes concentracions de glucosa, una proporció elevada de l'enzim passa a un cicle ràpid entre la forma oberta i la tancada sense relaxar-se de nou a la forma súper-oberta [120, 136, 140]. Per tant, es donen totes les característiques que encaixen amb un model mnemònic de cooperativitat per a la glucosa: 1) equilibri entre dues conformacions de GK amb diferents afinitats per a la glucosa; 2) predomini de la conformació de baixa afinitat en absència de glucosa; 3) interconversió lenta entre els estats conformacionals; 4) conversió de l'estat conformacional de baixa afinitat a alta afinitat accelerada quan la glucosa s'uneix a la GK; 5) només la forma d'alta afinitat és catalíticament activa i 6) la taxa de catàlisi és molt ràpida en comparació amb la taxa de transició conformacional. A més a més, aquest model ha permès determinar que els GKAs prevenen la relaxació cap a la forma súper-oberta, per tant afavoreixen el cicle catalític, i que s'uneixen a la GK només en presència de glucosa perquè el lloc al·lostèric no és present en la conformació súper-oberta.

3.2 Regulació de la GK

Donat el paper vital de la GK en el control del metabolisme de la glucosa, no és sorprenent que la seva regulació sigui complexa existint mecanismes de regulació tant a nivell transcripcional com post-transcripcional.

A. Regulació transcripcional

Un tret distintiu del gen de la GK en les espècies de mamífers és la presència de dos promotors alternatius. El gen de la GK consta de 11 exons que s'estenen al llarg de 49 Kb, la majoria de les quals són 35 Kb de DNA genòmic situades entre els dos promotors [141] (Figura 20). Aquests promotors alternatius permeten una regulació diferencial de la transcripció gènica en diferents teixits i condueixen a la producció de dues isoformes de GK, segons el teixit, que difereixen en la seqüència d'aminoàcids a l'extrem N-terminal, però comparteixen la resta de seqüència aminoacídica i també presenten propietats cinètiques idèntiques. Actualment no se sap si aquestes diferències de seqüència en els primers 12-14 aminoàcids tenen efectes funcionals [120].

1.- El promotor "upstream", anomenat també **neuroendocrí**, dirigeix la síntesi de mRNA de GK en les cèl·lules β dels illots pancreàtics (d'aquí que el primer exó es conegui amb el nom de 1 β). Més recentment s'ha demostrat que aquest promotor també controla l'expressió de la GK en les cèl·lules α i δ de l'illot pancreàtic, en cèl·lules enteroendocrines de l'estómac i de l'intestí prim, en el teixit hipotalàmic i en la glàndula pituitària [142-144].

Pel què fa a la regulació de la transcripció de la GK a les cèl·lules neuroendocrines, sembla que l'enzim s'expressa constitutivament i d'una forma mínimament regulada [145]. Tots els elements necessaris per a l'expressió semblen estar continguts en un fragment de 294 pb. Diversos factors positius i negatius podrien afectar-ne la transcripció (basant-se en estudis a la cèl·lula β pancreàtica): augmenta amb cAMP, biotina, àcid retinoic, lactogen placentari i insulina; i disminueix per bloquejants dels canals de calci, o per baixos nivells de calci al citosol. Tot i que la insulina no és suficient per a induir l'enzim, l'hormona és requerida per a una expressió òptima [121].

2.- El promotor "downstream" dirigeix la transcripció del gen de la GK exclusivament al fetge, d'aquí que també rebi el nom de **promotor hepàtic**. L'expressió d'aquest enzim al fetge respon a canvis nutricionals: en situació d'alimentació incrementen els nivells d'insulina la qual activa ràpidament la transcripció gènica de la GK; en canvi, en dejuni, el glucagó té un efecte inhibidor de la transcripció [146-148]. Els nivells de glucosa no tenen cap efecte sobre l'expressió de la GK al fetge. A continuació s'indiquen els elements reguladors amb més detall.

Regulació per insulina: La inducció per insulina és a través de la via de la PI_3 -cinasa/Akt, ja que el tractament d'hepatòcits amb inhibidors d'aquesta via (wortmanina i LY294002) anul·lava l'estimulació de la insulina sobre la transcripció de la GK [149-151]. No obstant, a dia d'avui encara no s'ha desxifrat cap IRE (*insulin response element*) en la seqüència promotora del gen de la GK hepàtica, ni tampoc quins són els reguladors transcripcionals que s'activen per la via de la insulina i regulen la transcripció del gen GK. Aquest fet es deu a dues raons: 1) encara no s'han determinat les seqüències exactes necessàries per a l'expressió específica de la GK al fetge, i 2) les línies cel·lulars hepàtiques emprades habitualment en els estudis *in vitro* no expressen la GK i en els cultius primaris d'hepatòcits té lloc una disminució de l'expressió en el temps, la qual cosa en dificulta l'estudi.

Foretz *et al* van suggerir que el mediador de l'efecte de la insulina sobre la transcripció de la GK hepàtica podia ésser **SREBP-1c** (*sterol-regulatory-element-binding protein-1c*) [14]. Des de llavors, diversos estudis han proporcionat evidències tant a favor com en contra d'aquesta hipòtesi (Taula 3):

Evidències que SREBP-1c regula GK	Evidències que SREBP-1c NO regula GK
<p>Estudi de Foretz <i>et al</i> [14]:</p> <ul style="list-style-type: none"> - SREBP-1c s'indueix per insulina a nivell transcripcional als hepatòcits. - En sobreexpressar SREBP-1c en hepatòcits en cultiu, s'observa un increment del contingut de mRNA de GK. - En sobreexpressar un dominant negatiu de SREBP-1c en hepatòcits en cultiu, no s'observa un increment del mRNA de GK. 	<p>Estudi de Stoeckman <i>et al</i> [152]:</p> <ul style="list-style-type: none"> - L'expressió induïble d'una forma madura de SREBP-1c en hepatòcits no produeix un increment de mRNA de GK.
<p>Estudi de Becard <i>et al</i> [153]:</p> <ul style="list-style-type: none"> - En ratolins amb diabetis de tipus 1 induïda amb estreptozotocina, la sobreexpressió hepàtica de SREBP-1c resulta en un increment dels nivells de mRNA i d'activitat GK, tal i com succeeix en administrar insulina. 	<p>Estudi de Liang <i>et al</i> [17]:</p> <ul style="list-style-type: none"> - En un animal genosuprimit per SREBP-1c, el mRNA de GK fou induït de manera normal durant les transicions dejuni-alimentació.
<p>Estudi de Liang <i>et al</i> [17]:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Quan els fetges dels ratolins no tenen formes madures de SREBP (ratolins deficientes per SCAP o S1P, que són proteïnes implicades en el processament de la proteïna SREBP madura) no es produeix l'augment dels nivells de mRNA de GK en re-alimentació. 	<p>Estudi de Ono <i>et al</i> [154]:</p> <ul style="list-style-type: none"> - En un animal genosuprimit per SREBP-1c, la infecció del fetge amb un virus que codifica per Akt (imitant la via de senyalització d'insulina) induïx fortament la transcripció de GK.
<p>Estudi de Kim <i>et al</i> [155]:</p> <ul style="list-style-type: none"> - S'han identificat dos elements de resposta a SREBP-1c en el promotor hepàtic de la GK, anomenats SREa i SREb. - S'ha demostrat <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> que SREBP-1c s'uneix als SREa i SREb del promotor hepàtic de la GK. 	<p>Estudi de Hansmann <i>et al</i> [156]:</p> <ul style="list-style-type: none"> - En experiments realitzats en hepatòcits en cultiu estimulats amb insulina, SREBP-1c no s'uneix al promotor de la GK però sí a FAS (típica diana de SREBP-1c). - La insulina produeix un increment del mRNA de GK en un temps en el qual encara no hi ha augment de la proteïna SREBP-1c madura. - La inducció de SREBP-1c, via inducció amb un lligand sintètic de LXR, produeix una activació de FAS sense detectar-se canvis en el mRNA de GK.
	<p>Estudi de Gregori <i>et al</i> [157]:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Amb estudis de "time-course" i genosupressió de SREBP-1c en hepatòcits en cultiu, demostren que la inducció de l'expressió de GK per insulina té lloc en absència de proteïna SREBP-1c madura al nucli.
	<p>Estudi de Denechaud <i>et al</i> [158]:</p> <ul style="list-style-type: none"> - L'expressió de GK augmenta correctament en la re-alimentació d'animals genosuprimits per LXRα/β, malgrat que presenten una absència total de la proteïna SREBP-1c madura al nucli.

Taula 3. Relació d'estudis sobre la regulació transcripcional de la GK per SREBP-1c.

Conjuntament, aquests estudis demostren que SREBP-1c no és essencial per a la inducció ràpida de la transcripció de la GK en resposta a la insulina, però pot tenir un paper a llarg termini. Per altra banda,

suggereixen que SREBP-1c podria actuar en sinèrgia amb un o més factors de transcripció per activar l'expressió de GK en resposta a insulina.

Un altre candidat pel control de l'expressió de GK dependent d'insulina és el complex format per **HIF-1 α** , **HNF-4** i **p300** [159]. Existia el coneixement previ de l'existència dels llocs d'unió per al factor de transcripció HNF-4 (*hepatocyte nuclear factor*) en els 100 primers pb del promotor hepàtic de la GK [141, 160], i també de l'existència de seqüències E-box on s'uneix el factor de transcripció HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor-1 α*). Segons aquesta hipòtesi, la unió de la insulina al seu receptor de membrana provoca l'activació de la via PI₃-cinasa/Akt, i a continuació s'indueix la fosforilació del coactivador transcripcional p300 i l'estabilització de la proteïna HIF-1 α . Quan p300, HNF-4 i HIF-1 α interaccionen en el promotor de la GK té lloc una important activació de l'expressió gènica [159]. La sinèrgia entre HIF-1 α (relacionat amb la hipòxia) i la insulina pot ésser important en l'expressió zonal de la GK al fetge perivenós, poc oxigenat en comparació amb la regió periportal.

Recentment, s'ha descrit que els **retinoids** sinergitzen amb la insulina per induir l'expressió de la GK hepàtica via activació de RAR (*retinoic acid receptor*) i RXR (*retinoid X receptor*) [161]. També ha aparegut un estudi en què es determina que cal **ERR- α** (*estrogen-related receptor- α*) per a la transcripció de la GK hepàtica en resposta a insulina [162]: demostren que existeix un lloc d'unió a ERR- α en la seqüència promotora de la GK i que cal la interacció entre PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activator receptor coactivator 1- α*) i ERR- α per tal que tingui lloc la transcripció gènica.

Regulació per glucagó: El glucagó i el seu segon missatger cAMP tenen un paper regulador negatiu sobre la transcripció de la GK. A més, el seu efecte inhibidor de la transcripció és dominant sobre la insulina [146]. Per tant, el glucagó o el cAMP provoquen una disminució ràpida del mRNA de GK per tal de minimitzar la despesa energètica en períodes de restricció calòrica.

Regulació per glucocorticoids i hormones tiroïdees: els glucocorticoids són un requisit per a la inducció del mRNA de GK per insulina en els cultius primaris d'hepatòcits; el seu efecte és permissiu ja que la presència de glucocorticoids per si sola no activa la transcripció del gen [146]. Per altra banda existeixen dos estudis en hepatòcits de rates neonates en què la hormona tiroïdea T3 promou l'increment dels nivells de mRNA de GK [163, 164].

Altres elements que poden estar implicats en la transcripció de la GK hepàtica són:

- **HNF-6** (*hepatocyte nuclear factor-6*), el qual és un transactivador hepàtic que juga un paper important en la diferenciació del fetge i contribueix a la regulació transcripcional d'enzims gluconeogènics com la PEPCK i la glucosa-6-fosfatasa. S'han detectat dos llocs d'unió per HNF-6 al

promotor hepàtic de la GK i s'ha determinat que HNF-6 promou l'activació basal d'aquest promotor [165].

- **HNF-3 β** (*hepatocyte nuclear factor-3 β*) té seqüències d'unió al promotor hepàtic de la GK [166].

- **PPAR- γ** (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) pot activar directament la transcripció de la GK via la unió als PPRE (*PPAR- γ response element*) detectats a la seqüència promotora de la GK hepàtica. La inducció de la transcripció té lloc mitjançant la formació del dímer PPAR- γ -RXR [167]. Aquesta troballa obre la possibilitat que la inducció de la GK hepàtica per PPAR- γ sigui un dels efectes beneficiosos dels fàrmacs thiazolidinediones (TZD), activadors de PPAR- γ que s'empren en el tractament de la diabetis tipus 2.

- La **fructosa-2,6-bisfosfat** provoca l'activació de la via d'Akt i s'ha demostrat *in vitro* i *in vivo* que condueix a un increment de la transcripció de la GK hepàtica en absència d'insulina [33].

B. Regulació post-transcripcional

La GK hepàtica i la GK pancreàtica (parlem de GK pancreàtica perquè la majoria d'estudis s'han realitzat a la cèl·lula β del pàncrees), tot i tenir característiques cinètiques iguals, presenten alguns mecanismes de regulació post-transcripcional diferents. Per exemple, el contingut de GK a la cèl·lula β pancreàtica és modulats per la glucosa. Sembla ser que la glucosa s'uneix a l'enzim i l'estabilitza, disminuint-ne el recanvi proteic i, per tant, incrementant-ne el contingut cel·lular sense que això impliqui un augment del metabolisme [168]. En canvi, la glucosa no afecta el contingut de GK al fetge.

A la Taula 4 es presenten els mecanismes de regulació post-transcripcional que es coneixen actualment per a la GK i que seran ampliat en els apartats següents d'aquest capítol.

Mecanismes de regulació post-transcripcional	GK de la cèl·lula β	GK hepàtica
Estabilització per glucosa	Sí	no
MODIFICACIONS COVALENTS:		
fosforilació	?	sí
Nitrosilació	Sí	?
INTERACCIONS PROTEÏQUES:		
GKRP	no	sí
PFK-2	sí	sí
BAD	sí	sí
NOS	sí	?
Penta-ubiquitina	sí	sí
GKAP	?	sí
Precursor de la propionil-CoA carboxilasa	sí	?
REGULACIÓ AL·LOSTÈRICA:		
Acils-CoA	?	sí
GKAs	sí	Sí

Taula 4. Mecanismes de regulació post-transcripcional descrits per a la GK.

B.1 Modificacions covalents:

S'ha descrit que la GK pot presentar dos tipus de modificacions covalents: 1) fosforilació dels residus de serina/treonina i 2) nitrosilació dels residus de cisteïna. No es coneix encara, però, si aquestes modificacions tenen un paper fisiològic en la regulació de l'activitat GK.

Ekman *et al* van descriure fa uns 20 anys que la GK hepàtica de rata podia ésser **fosforilada per PKA** (*cAMP dependent protein kinase*) en residus de serina i que aquesta fosforilació provocava una inactivació parcial de l'enzim [169]. Treballs més recents han confirmat la fosforilació per PKA d'una GK recombinant i la consegüent inactivació de l'activitat GK (30%) [170]. La GK té el motiu conservat RRXT (aa 428-431) i dos motius RXS (aa 359-361 i 395-398). Els motius RXS normalment són substrat de PKA *in vitro* però no *in vivo*, mentre que el motiu RRXS/T és sovint un substrat *in vivo*. Podria ésser que la fosforilació de la GK per PKA contribueixi a la inhibició de la fosforilació de la glucosa per glucagó, però encara no s'ha demostrat.

A diferència de les altres HK de vertebrats i de llevat, la proteïna GK presenta un alt contingut de residus de cisteïna i és molt sensible a què els seus grups sulfhidril siguin oxidats. L'estat redox dels grups sulfhidril afecten l'activitat catalítica de l'enzim, ja que s'ha observat que en assajos d'activitat en absència d'agents protectors de grups tiol (ditiotreitòl o mercaptoetanol) l'activitat GK va decaient amb el temps. Aquesta disminució de l'activitat s'explica perquè, en estar oxidada als grups sulfhidril, es formen ponts disulfur que bloquegen els canvis conformacionals requerits pel procés catalític de la GK [171-173]. S'ha detectat que quatre dels residus cisteïna de la GK estan inclosos en motius de **nitrosilació** (aa 220, 364, 371, 434) i, a més, s'ha demostrat que són nitrosilats en les cèl·lules β [174, 175]. Si la nitrosilació causa activació catalítica no s'ha determinat, però sembla estar implicada en un mecanisme de regulació de la secreció d'insulina estimulada per glucosa [174].

B.2 Interaccions proteïques:

La distribució intracel·lular i la funció de la GK estan influïdes per l'associació de l'enzim amb altres macromolècules. A més, podria ésser que les interaccions proteïques fossin una estratègia per preservar l'activitat enzimàtica de la GK, ja que com s'ha esmentat anteriorment, és un enzim inestable degut a la seva alta sensibilitat a l'oxidació dels grups sulfhidril.

a) Interacció amb la GKR (glucokinase regulatory protein)

La GKR és el principal mecanisme de regulació post-transcripcional de la GK hepàtica i afecta tant l'activitat com la localització subcel·lular de l'enzim. Fou descoberta per Van Schaftingen *et al* a partir de dues observacions anteriors que havien suggerit l'existència d'un mecanisme inhibidor de la fosforilació de glucosa al fetge [176]:

- La primera fou el descobriment que la fosforilació de la glucosa en hepatòcits intactes tenia una dependència sigmoïdal en la glucosa, però amb una menor afinitat que l'esperada a partir de la cinètica de l'enzim purificat. Aquesta baixa afinitat fou restablerta si es canviava el Na^+ extracel·lular per K^+ [177].
- La segona observació anòmala fou que concentracions micromolars de fructosa estimulaven la fosforilació de la glucosa en hepatòcits en cultiu primari [178].

Com que la fructosa és metabolitzada a fructosa-1-fosfat als hepatòcits, es postulà que la GK era regulada per un mecanisme inhibidor que es revertia amb la fructosa-1-fosfat. A continuació, s'identificà una proteïna en extractes de fetge mitjançant un fraccionament per cromatografia d'intercanvi iònic, i aquesta proteïna complia els requisits d'inhibir la GK i el seu efecte inhibidor era revertit amb la fructosa-1-fosfat [176]. S'anomenà proteïna reguladora de la GK (GKRP). La GKRP no s'havia pogut detectar prèviament perquè la seva unió a la GK és baixa en els assajos convencionals de GK, que es realitzen en un medi que conté 100 mM de glucosa i 100 mM de KCl. Després d'aquesta troballa, la unió de la GK hepàtica a la GKRP s'ha demostrat per ultracentrifugació [179], per cromatografia d'exclusió [180], per co-immunoprecipitació [181] i pel sistema dels dos híbrids en llevats [182].

Pel què fa a la modulació de l'activitat GK, la GKRP n'és un inhibidor competitiu respecte la glucosa. El model de regulació que s'ha proposat és que la GKRP existeix en dues conformacions, una de baixa afinitat per a la GK i l'altra, d'alta [183]. La fructosa-6-fosfat i la fructosa-1-fosfat, les quals competeixen per un mateix lloc d'unió a la GKRP, afavoreixen l'estat d'alta afinitat o de baixa afinitat, respectivament. La unió de la fructosa-6-fosfat a la GKRP afavoreix la interacció GKRP-GK amb un efecte negatiu sobre l'activitat enzimàtica; mentre que la unió de la fructosa-1-fosfat debilita la interacció GKRP-GK i allibera GK activa (Figura 15). La fructosa-1-fosfat intrahepàtica augmenta després de l'absorció intestinal de fructosa, la qual és convertida a fructosa-1-fosfat per la fructocinasa hepàtica. En canvi, la inhibició de la GK per fructosa-6-fosfat lligada a la GKRP podria ésser un mecanisme indirecte de regulació per "*feedback*" negatiu, ja que la fructosa-6-fosfat està en equilibri amb la glucosa-6-fosfat (producte de la reacció de la GK), tot i que no està clara la seva rellevància a nivell fisiològic. Tenint en compte que la inhibició de la GK per GKRP és competitiva amb la inhibició per manohexulosa (estabilitza la conformació súper-oberta de la GK), però és independent de la inhibició per N-acetilglucosamina (estabilitza la conformació tancada de la GK) [184, 185], es va concloure que la GKRP s'uneix a la GK en conformació súper-oberta.

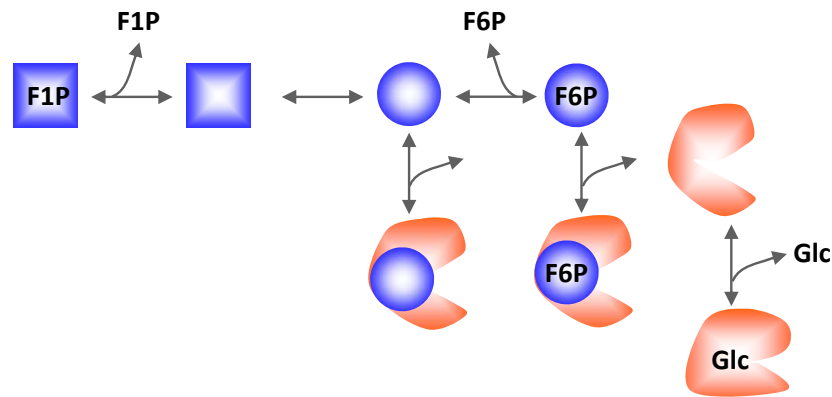


Figura 15. Model de l'acció de la GKR sobre la GK. La fructosa-6-fosfat (F6P) i la fructosa-1-fosfat (F1P) s'uneixen a dues conformacions diferents de GKR, simbolitzades per cercles o quadrats (color blau). Només una d'aquestes dues conformacions pot unir-se a la GK (color taronja). La unió entre GK i GKR és competitiva respecte la glucosa. [Adaptat de Van Schaftingen et al. (2004) *Discovery and role of glucokinase regulatory protein*. In *Glucokinase and Glycemic Disease. From Basics to Novel Therapeutics* (Matschinsky, F.M. and Magnuson, M.A., eds) Vol. 16, pp. 193-207, Karger, Basel)]

Pel què fa a la regulació de la localització subcel·lular de la GK, la GKR juga un paper fonamental en la importació de la GK al nucli i en la localització de la GK al compartiment nuclear. Els animals "null" de GKR presenten la GK localitzada al citoplasma, fins i tot a baixa concentració de glucosa [186, 187]. Aquests estudis posen de manifest que la GKR és essencial per a la importació de la GK al nucli, ja que la seqüència proteïca de la GK no presenta cap senyal d'importació al nucli. En canvi, sí que conté un senyal d'exportació (NES *nuclear export signal*) [188]. Diversos treballs suporten aquesta teoria: quan cèl·lules HeLa [188, 189] o cèl·lules embrionàries de ronyó humà [190] són transfectades amb el gen de la GK, la proteïna presenta una localització citosòlica i no s'acumula al nucli ni en presència de leptomicina B (la qual inhibeix l'exportació nuclear depenent de senyal). En contrast, quan la GK és coexpressada amb GKR [188, 190], ambdues proteïnes s'acumulen al nucli. També s'ha usat una forma mutant de GK amb una afinitat reduïda per a la GKR i s'observa que la GK no es transloca al nucli ni en presència ni en absència de GKR, de manera que es confirma que la GKR és imprescindible per a l'entrada de la GK al nucli [188, 189]. Totes aquestes dades estan corroborades per estudis d'immunotinció de fetges d'animals: en situació d'alimentació la GK té una distribució citosòlica, mentre que en situació de dejuni s'observa una localització de la GK majoritàriament nuclear [191, 192].

Tot i que la GKR és essencial per a la localització nuclear de la GK, a dia d'avui encara no s'ha resolt quin és el mecanisme d'entrada de la GK al nucli. Transloca al nucli independentment de la GKR o en conjunció? Per poder-ho resoldre primer caldria aclarir si existeix un *pool* citoplasmàtic de GKR a més del *pool* nuclear. La majoria d'estudis *in vitro* i *in vivo* han demostrat que la GKR és present únicament al nucli [186, 188, 189, 193, 194], però altres suggereixen que existeix un trànsit de GKR entre el nucli i el citoplasma [195, 196]. En principi, la importació de proteïnes al nucli té lloc via

porus nuclears i implica el reconeixement de seqüències de localització nuclear (NLS *nuclear localization signal*). Com que la GK no té NLS, és incapaç d'entrar al nucli per si sola. Com que tots els estudis demostren que es requereix GKRП per detectar GK al nucli, s'ha assumit que la GK s'importa al nucli de forma dependent de GKRП. Segons Shiota *et al* la GKRП tindria un senyal NLS i la importació de les dues proteïnes al nucli seria a través d'un sistema *piggy-back* [188]. A baixes concentracions de glucosa, la formació del complex GKRП-GK resultaria en l'entrada i el segrestament d'ambdues proteïnes al nucli. El fet que la unió GKRП-GK emmascari la seqüència NES de la GK (entre els aa 300 i 310) podria ésser part del mecanisme. En estats metabòlics acompanyats d'altres concentracions de glucosa i/o altes concentracions de fructosa-1-fosfat i suficients nivells d'ATP, el complex GKRП-GK es dissociaria i la seqüència NES de la GK seria funcional, permetent la ràpida exportació de la GK del nucli.

Pel què fa a l'exportació també existeixen llacunes de coneixement, principalment sobre si la dissociació del complex GK-GKRП té lloc exclusivament al nucli i també sobre si la GKRП s'exporta o no al citoplasma durant aquest procés. La **dissociació del complex GK-GKRП** pot ésser induïda per 3 classes de compostos: 1) precursors de fructosa-1-fosfat (com la fructosa i el sorbitol) i també tagatosa la qual és metabolitzada a tagatosa-1-fosfat, un anàleg de la fructosa-1P [197, 198]; 2) concentracions milimolars de glucosa (20 mM) i anàlegs de glucosa com la manoheptulosa, 5-tioglucosa i glucosamina [199]; 3) activadors de la GK farmacològics (GKAs) [180, 200]. Com que els GKAs afavoreixen la conformació tancada de la GK, i la manoheptulosa i la glucosamina mimetitzen el canvi conformacional induït per la glucosa, els efectes d'aquests compostos s'expliquen per una menor afinitat de la GKRП per a la conformació tancada de la GK. Hi ha un fort sinergisme entre els precursors de la fructosa-1-fosfat i dels anàlegs de glucosa sobre la dissociació de la GK. Aquest fet pot explicar-se per la unió d'aquests lligands amb al GKRП i la GK, respectivament. Els precursors de la fructosa-1-fosfat provoquen una dissociació del complex més ràpida que la provocada per glucosa o manoheptulosa, ja que les últimes requereixen una transició conformacional de la GK que és lenta [13]. Un cop s'ha dissociat el complex GK-GKRП, la GK lliure pot ésser exportada lliurement gràcies a la seqüència NES que conté. Existeix una hipòtesi alternativa, amb el suport de les observacions que la GKRП transloca en tàndem amb la GK durant l'estimulació per substrat [195, 196], segons la qual la GKRП transloca al citoplasma conjuntament amb la GK tant com a complex dimèric o com a proteïnes lliures. Totes aquestes hipòtesis estan representades a la Figura 16.

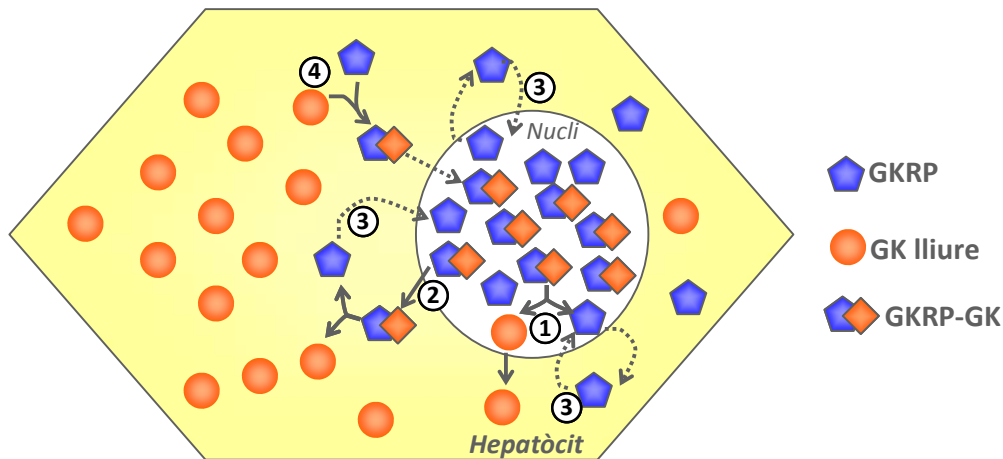


Figura 16. Localització subcel·lular de la GK i la GKR. A 5 mM de glucosa, la GK és segrestada al nucli on roman inactiva unida a la GKR. Després de la injecció, l'augment de la concentració de glucosa provoca la translocació de la GK al citoplasma: el complex GKR-GK pot dissociar-se al nucli, seguit de l'exportació de la GK i potser també de la GKR (1), o bé, el complex pot sortir del nucli i dissociar-se al citoplasma (2), on la GKR pot romandre o pot retornar al nucli (3). Després de la fase absorbentiva, quan la glucosa torna a nivells baixos, la GK és importada al nucli presumptament unida a la GKR (4).

Existeixen altres factors que també afecten la dissociació del complex GKR-GK induïda per glucosa. La insulina afavoreix la dissociació del complex [198], mentre que la dissociació és contrareestada per glucagó [198], etanol [197], glicerol [197], activadors de l'AMPK [201], un baix contingut cel·lular de fructosa-2,6-bisfosfat [202, 203], i la depleció d'ATP [198, 204]. La inhibició de la dissociació del complex que provoquen aquests factors esmentats no es pot explicar per canvis en el contingut de fructosa-1-fosfat/fructosa-6-fosfat. Aquest fet indica que altres mecanismes hi estan involucrats, com podria ésser la modificació covalent de la GKR o bé l'existència d'altres proteïnes d'unió. En el cas de la modificació covalent de GKR, s'ha demostrat que és substrat de l'AMPK la qual la fosforila al residu Ser₄₈₁ [201].

El significat fisiològic de la interacció de la GK amb la GKR pot deduir-se considerant les dades següents:

- Els ratolins deficientes en GKR presenten una reducció dels nivells de proteïna GK al fetge, malgrat que expressen els mateixos nivells de mRNA de GK que els animals control [186, 187]. Aquest fet indica que **la GKR estabilitza i protegeix el pool de GK intracel·lular**. Per altra banda, la localització exclusivament citoplasmàtica de la GK en els ratolins *knock-out* de GKR és una evidència inequívoca del **papel de la GKR en segrestar la GK al nucli**. Pel què fa al fenotip, tenen un control alterat de la glicèmia post-prandial, tot i que no presenten una reducció de la secreció d'insulina ni canvis en la glicèmia en dejú. La disminució de l'activitat GK en els heterozigots i els

homozigots era major en dejuni (38% i 85%, respectivament) que en alimentació (15%, 52%), suggerint que en estat d'alimentació existeixen altres mecanismes que estableixen la GK.

- Usant un assaig basat en la inhibició de la GK hepàtica de rata, es va poder detectar GKRП en el fetge de totes les espècies animals testades que expressen GK, com per exemple, rata, home, porc, gos, conill, tortuga i *Xenopus laevis*. Els fetges d'espècies que no expressen GK, com el gat o la cabra, no tenen GKRП detectable [205]. Per altra banda, durant la ontogènia, l'expressió de la GKRП precedeix a la de la GK: la GKRП apareix al fetge de rata pocs dies abans del naixement, i la seva concentració augmenta progressivament durant el primer mes de vida extrauterina. GKRП és doncs present al fetge quan la GK comença a aparèixer a la tercera setmana de vida [205]. Per tant, la GK al fetge no s'expressa sense la GKRП. També cal considerar que la GKRП sempre està present en excés molar sobre la GK (la ratio molar GKRП/GK és de l'ordre de 3 en rates alimentades) [206]. Tot plegat és consistent amb el concepte que **GK i GKRП formen una unitat funcional i que la GKRП és necessària per al funcionament adequat de l'enzim**.
- A nivell de regulació transcripcional, el mRNA de la GKRП és induït per altes concentracions de glucosa però aparentment no per la insulina. La regulació diferencial per insulina dels nivells de mRNA de GK i de GKRП fa preveure que la insulina augmenta l'afinitat de l'hepatòcit per a la glucosa mitjançant un increment de la ratio GK/GKRП, mentre que les concentracions elevades de glucosa i la resistència a insulina tindrien l'efecte contrari i provocarien una disminució de l'afinitat per la glucosa [13].
- La sobreexpressió mitjançant adenovirus de GKRП en ratolins amb diabetis de tipus 2 induïda per una dieta rica en greixos provoca una millora de la glicèmia en dejuni i en un test de tolerància a glucosa [207]. Aquest fenotip pot ésser conseqüència de la millora en la sensibilitat a la insulina, disminució del pes corporal, i un augment dels nivells de triglicèrids sanguinis en dejuni. A diferència d'altres estudis de sobreexpressió de la GKRП *in vitro* [208], els nivells de proteïna GK hepàtics en aquest model animal no incrementaren.

En les rates diabètiques Zucker hi ha un defecte en la translocació de la GK, ja que la GK està predominantment localitzada al nucli i no es transloca quan hi ha un augment de glicèmia i insulinèmia. Tot sembla indicar que aquesta podria ésser una de les causes que condueix a la diabetis [209].

Estudis a tot el genoma realitzats per l'Associació "*Diabetes Genetics Initiative*" (DGI) han proporcionat evidència que el locus on està localitzat el gen de la GKRП està associat amb alts nivells de triglicèrids en plasma en dejú. De tots els polimorfismes de nucleòtid únic (SNPs, *single nucleotide polymorphism*), rs780094 explica la gran proporció de la variabilitat interindividual en els nivells de TAG plasmàtics [210]. L'estudi d'aquest polimorfisme en la població danesa va demostrar una forta associació entre aquest al·lel i els nivells elevats de TAG en dejuni,

conjuntament amb una disminució dels nivells d'insulina i una reducció del risc de diabetis de tipus 2 [211].

Conjuntament aquests estudis indiquen que **la GGRP ocupa un lloc central en la regulació de les vies hepàtiques del metabolisme de glúcids i de lípids així com de la sensibilitat a la insulina**, ja que la GGRP és capaç d'afectar l'ús hepàtic de glucosa i la sensibilitat dels hepatòcits als canvis en les concentracions de glucosa.

En conclusió, la interacció de la GK amb la GGRP provoca una inhibició de l'activitat GK a causa del segrestament de la GK al nucli. La importància d'aquesta localització nuclear és que permet estabilitzar la proteïna GK i que n'existeixi un gran reservori, el qual pot mobilitzar-se ràpidament després de la ingesta per activar l'ús i l'emmagatzemament de la glucosa al fetge (la translocació té lloc en 30 minuts [193]). Per tant, és un procés de regulació molt més ràpid i eficient que la inducció de la síntesi *de novo* de GK per insulina. Per altra banda, el fet que la GK retorni al nucli quan s'ha acabat el procés de captació de glucosa podria disminuir el cicle fútil entre la glucosa i la glucosa-6-fosfat a l'hepatòcit per tal de no malgastar energia [193]. En la mateixa línia, l'activitat GK genera un senyal de glucosa que activa la transcripció de diversos gens glicolítics i lipogènics. Per tant, en situació post-absortiva és necessari retornar la GK al nucli per evitar el manteniment de la transcripció d'aquests factors els quals ja no són requerits i així també estalviar energia.

A part del fetge, també s'ha descrit la presència de la GGRP a l'hipotàlem [212, 213] on realitzaria funcions de regulació de la GK que encara no s'han especificat.

b) Interacció amb la 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2)

L'enzim PFK-2 és responsable de la formació i degradació regulada de la fructosa-2,6-bisfosfat, un activador al·lostèric clau de l'enzim 6-fosfofructo-1-cinasa, i per tant, de la glicòlisi. Mitjançant el sistema dels 2 híbrids en llevat, es va demostrar que la GK interaccionava amb els dominis fosfatasa de la PFK-2, tant de la isoforma de PFK-2 present a la cèl·lula β pancreàtica, com de la PFK-2 de fetge [182].

Per entendre la funció biològica de la interacció GK-PFK-2 al pàncrees, es va sobreexpressar la PFK-2 en cèl·lules d'insulinoma i el resultat obtingut fou un increment de l'activitat específica GK sense canvis en els nivells de proteïna GK [214, 215]. Aquest increment de l'activitat GK estava relacionat amb un increment de la secreció d'insulina estimulada per glucosa.

En el fetge, la unió d'un petit *pool* de GK a la PFK-2 sembla estar relacionat amb l'activació de la GK així com amb un augment de l'activitat cinasa de la PFK-2 que comporta un increment del contingut

de fructosa-2,6-bisfosfat. Per tant, la formació del complex GK-PFK-2 promou una activació coordinada de la fosforilació de glucosa i de la glicòlisi al fetge que podria ésser important en situacions de re-alimentació [203, 216].

En conjunt, s'ha proposat que la PFK-2 és un lligand citosòlic per a la GK que pot funcionar com un activador de l'activitat GK [13, 203]. Resta entendre el mecanisme d'aquesta activació. Podria ésser que la interacció GK-PFK-2 protegís la GK de l'oxidació dels grups SH i afectés la quantitat de proteïna GK activa, o bé que la unió de la PFK-2 provoqués una activació al·lostèrica de la GK similar a la promoguda pels GKAs farmacològics.

c) Interacció amb BAD

BAD funciona com una altra proteïna lligand de GK tant als illots pancreàtics com als hepatòcits que comporta la localització de la **GK associada a la membrana mitocondrial externa** (no s'ha estudiat en els altres tipus cel·lulars que expressen GK) [217, 218]. Es descobrí l'existència de la interacció BAD-GK en estudiar ratolins genosuprimits per BAD: els desapareixia un complex multiproteic associat a la membrana mitocondrial externa que està format per BAD, GK, WAVE (wiskott-aldrich family member), subunitats catalítiques de la proteïna fosfatasa 1 (pp1) i de la proteïna kinasa a (pka).

En els hepatòcits, la interacció BAD-GK està implicada en el manteniment del metabolisme oxidatiu de la glucosa perquè estava reduït en els hepatòcits dels ratolins *knock-out* de BAD (s'observava una disminució de la respiració mitocondrial) [217]. No obstant, cal tenir precaució perquè la GK associada als mitocondris és una petita fracció del contingut total de GK.

A la cèl·lula β pancreàtica, els ratolins *knock-out* de BAD presentaven una secreció d'insulina que no responia a glucosa. La secreció d'insulina es restablí en introduir-hi pèptids amb una seqüència comparable a BAD i, a més, també incrementaven l'activitat GK [218]. S'ha suggerit que BAD serveix per a 2 funcions a les cèl·lules β : 1) quan està fosforilat, BAD té una funció metabòlica com a mitjancer de la unió de la GK al mitocondri; 2) quan està desfosforilat funciona com un modulador negatiu dels factors antiapoptòtics BAX i BAK. Els nivells de glucosa alts desplacen l'equilibri entre la forma unida a GK i les formes unides a BAX i a BAK, estimulant la secreció d'insulina i la supervivència de la cèl·lula β augmentant la massa de cèl·lules β de manera dependent de la glucosa (Figura 17) .

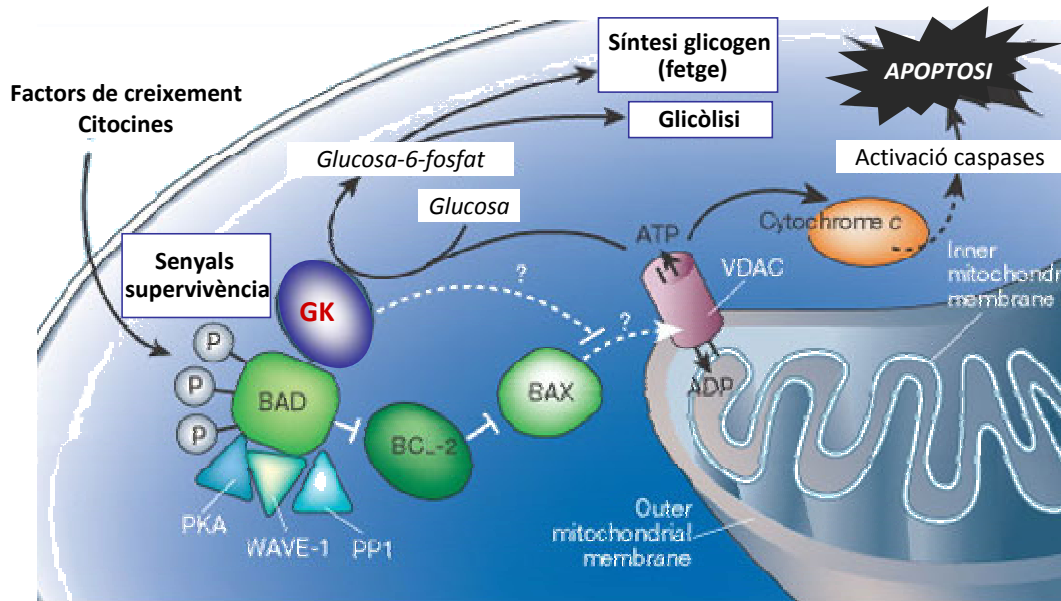


Figura 17. Esquema de la interacció entre BAD i GK. (Adaptada de Downward *et al* [219]).

d) Altres interaccions proteïques

L'impacte del model de GKRP va conduir a diversos investigadors a la recerca d'altres proteïnes que puguin afectar l'activitat o la localització de la GK, sobretot a les cèl·lules β on la GKRP és absent. De les proteïnes que s'han trobat, recollides a la Taula 5, cal fer més investigacions per provar que la seva interacció amb la GK té un impacte en l'activitat GK i/o en la funció cel·lular.

	Importància funcional	Referències
NOS (nitric oxide synthase)	A la cèl·lula β , la NOS nitrosila la GK i facilita la seva associació amb grànuls d'insulina	[175]
Penta-ubiquitina	La unió d'ubiquitina a residus de lisina de la GK provoca una activació de l'activitat GK	[220]
GKAP (glucokinase-associated protein)	La interacció s'identificà pel sistema de 2 híbrids en llevat amb una llibreria de cDNAs de fetge. Estimula l'activitat GK.	[170]
Subunitat precursora de la propionil-CoA carboxilasa	La interacció s'identificà pel sistema de 2 híbrids en llevat amb una llibreria de cDNAs de cèl·lula β . Estimula l'activitat GK.	[221]

Taula 5. Altres interaccions proteïques descrites per a la GK.

B.3 Regulació al·lostèrica:

A nivell d'assaig enzimàtic de la GK, s'ha descrit que els àcids grassos de cadena llarga (Acils-CoA) són potents inhibidors de la GK, amb una inhibició competitiva respecte tant a la glucosa com a l'ATP. Els Acils-CoA no s'uneixen al centre catalític i sembla que generen un canvi conformacional de l'enzim

[222-224]. A nivell d'hepatòcits, es va observar un petit efecte inhibitori del palmitat sobre la fosforilació de glucosa, així com un descens del contingut cel·lular de la glucosa-6P [222]. Tot i que no està clar si els Acils-CoA són inhibidors al·lostèrics de la GK *in vivo*, la supressió fisiològica de l'activitat GK a elevades concentracions d'àcids grassos és plausible.

Per altra banda, s'ha postulat l'existència d'un activador al·lostèric de la GK basant-se en: 1) els estudis de Wals *et al*, que van observar discrepàncies entre les taxes mesurades de fosforilació de glucosa i les esperades en assajos de marcatge de la glucosa amb $^2\text{H}_2\text{O}$ en hepatòcits [225]. 2) el descobriment dels activadors farmacològics de la GK (GKAs) [137], que causen un augment de l'activitat enzimàtica en unir-se en un lloc al·lostèric putatiu, diferent del centre actiu, descrit per Kamata *et al* [136]. Tot i que no es coneixen activadors al·lostèrics fisiològics de la GK, de moment s'han proposat diverses proteïnes com a candidats a activadors al·lostèrics de la GK: GKAP, la subunitat precursora de la propionil-CoA carboxilasa, la PFK-2 o la poliubiquitina (Taula 5) [13].

3.3 Funció biològica de la GK als teixits on s'expressa

Cèl·lula β pancreàtica

En aquestes cèl·lules pancreàtiques encarregades de sintetitzar i secretar insulina en resposta a la glicèmia, cal un mecanisme sensor de glucosa. La GK és la molècula encarregada de desenvolupar aquest paper per diverses raons [123]. Les característiques bioquímiques de l'enzim són tals que les concentracions fisiològiques de glucosa (4-8 mM) poden determinar la taxa del metabolisme de glucosa a la cèl·lula β , ja que el transport de glucosa no és limitant (gràcies a l'abundància del transportador de glucosa GLUT-2). A més, les cèl·lules β no tenen pràcticament maquinària per a la síntesi i degradació de glicogen. Això significa que la taxa de glicòlisi és determinada íntegrament per la concentració intracel·lular de glucosa, al contingut de GK i als nivells del substrat MgATP (que acostumen a ésser saturants). Aquest disseny bioquímic permet a la D-glucosa dirigir i regular el metabolisme intermediari de la cèl·lula β i la generació de factors que acoblen el metabolisme a la biosíntesi i secreció d'insulina amb una força de control propera a la unitat.

Com que a la cèl·lula β hi ha baixa activitat LDH (*lactate dehydrogenase*) i hi existeixen eficients transportadors d'hidrogen als mitocondris, el producte predominant de la glicòlisi en aquestes cèl·lules és el piruvat. Els nivells citosòlics de piruvat i l'acció de 2 enzims mitocondrials, la piruvat deshidrogenasa (genera acetil-CoA per al cicle de Krebs) i la piruvat carboxilasa (produeix oxalacetat i inicia el cicle del piruvat), determinen la taxa del metabolisme de piruvat. Aquestes dues reaccions regulant la generació d'ATP i l'anaplerosi del cicle de krebs, respectivament, són processos crucials

downstream en el procés de secreció d'insulina estimulat per glucosa. Tot plegat condueix a què un increment del metabolisme de glucosa provoqui un augment del potencial (ATP:ADP+Pi) que és causant de la despolarització de la membrana cel·lular. És així perquè s'inhibeixen els canals de K^+ sensibles a ATP, la qual cosa activa l'entrada de calci extracel·lular a través dels canals de calci dependents de voltage i també es generen altres segons missatgers, com l'cAMP i el diacilglicerol (DAG). L'increment citosòlic de Ca^{2+} , cAMP i DAG cooperen per dirigir l'exocitosi dels grànuls que contenen la insulina (Figura 18) [120, 121, 144, 168]. Per tant, la secreció d'insulina és totalment dependent del metabolisme de glucosa iniciat amb la GK.

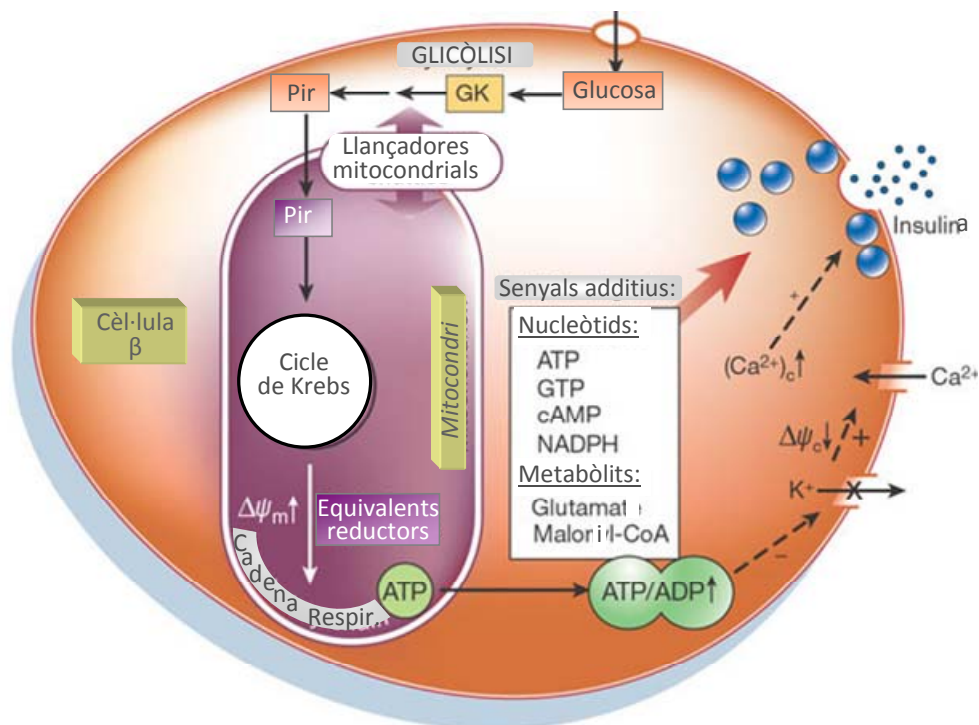


Figura 18. L'activitat GK controla la secreció d'insulina estimulada per glucosa a la cèl·lula β pancreàtica. (Figura adaptada de Maechler *et al* [226]).

Petits canvis en l'activitat GK poden ésser significatius fisiològicament, ja que afecten directament el llindar de la secreció d'insulina estimulada per glucosa (GSIR *glucose-stimulated insulin secretion*). Altres factors metabòlics associats, com el Malonil-CoA, els àcids grassos de cadena llarga, el glutamat, la glutamina, etc, modulen el GSIR [120, 121, 144, 168].

Cèl·lula α pancreàtica

Tot i que molt menys estudiada que a la cèl·lula β , la GK també s'expressa a les cèl·lules α encarregades de produir glucagó. Existeixen evidències que l'activitat GK senyalitza un efecte inhibitori directe de la glucosa sobre la secreció de glucagó [227-229].

Cèl·lules neuroendocrines de l'intestí

A l'intestí prim hi ha cèl·lules que responen a glucosa i que contenen GK, anomenades cèl·lules L. Aquestes cèl·lules produeixen GLP1 (*glucagon-like peptide 1*) en resposta a glucosa, perquè funcionen com a cèl·lules sentinel·les per quantificar la disponibilitat de nutrients en la ingesta a l'intestí i senyalitzar aquesta informació cap al pàncrees endocrí i cap al cervell. No obstant, el mecanisme per sentir la glucosa és diferent del que té lloc a les cèl·lules β pancreàtiques: les cèl·lules L no tenen GLUT-2, sinó que tenen transportadors de glucosa dependents de Na^+ i sembla que la glucosa indueix la despolarització de la membrana i l'alliberament de GLP1 a causa d'un increment de Na^+ , més que no pas per un increment del metabolisme de glucosa [230]. De fet, un estudi recent conclou que la GK no és el principal sensor de glucosa a les cèl·lules L humanes, tot i que no ofereix suggeriments de quin seria el paper de l'enzim [231].

Neurones de l'hipotàlem

Diversos grups identificaren la presència del mRNA i de la proteïna GK a l'hipotàlem [232-234], concretament al nucli arcuat i a la regió ventromedial. A la regió ventromedial, el mRNA de la GK s'expressa a les neurones que sintetitzen POMC (*pre-proopiomelanocotin*) i neuropeptide Y (NPY)/*agouti-related peptide* (AgRP) les quals juguen un paper crític en les vies neuronals involucrades en la regulació de la ingesta i de la despesa energètica. Diversos estudis han demostrat que a la regió ventromedial de l'hipotàlem, la GK actua com un enzim que determina el flux del metabolisme de glucosa i controla l'excitabilitat neuronal [235-237]. Moltes neurones estan equipades amb canals de K^+ sensibles a ATP, i l'excitabilitat d'aquestes neurones pot ésser controlada per la taxa de metabolisme de glucosa i les fluctuacions d'ATP cel·lulars, d'una manera semblant al que passa a la cèl·lula β [238]. Per tal que el sistema sigui semblant a la cèl·lula β cal un transport de glucosa il·limitat, com el mitjançat per GLUT-2 el qual també ha estat localitzat en aquestes cèl·lules hipotalàmiques [239]. Per altra banda, metabòlits derivats del metabolisme de la glucosa, com el Malonil-CoA (intermediari de la via lipogènica), poden tenir un paper senyalitzador intracel·lular [240].

No obstant, aquesta hipòtesi que la GK és un sensor de glucosa al cervell és controvertida perquè la concentració de glucosa intersticial és de 1.5 mM al cervell, per sota del rang òptim de concentracions en què la GK presenta una cintètica ultrasensible respecte la concentració de glucosa.

Cèl·lules gonadotropes i tiotropes de la glàndula pituïtària (o hipòfisi)

Les gonadotropines són hormones que regulen la fertilitat (la qual és profundament influïda per la disponibilitat energètica) mitjançant la regulació de la producció d'hormones sexuals i esperma, i el creixement i maduració dels oòcits. L'alliberament de gonadotropina és regulat per la GNRH (*hypothalamic gonadotropin-releasing hormone*). S'especula que l'alliberament de gonadotropina és regulat de manera dependent de glucosa a la glàndula pituïtària, amb la GK servint com a sensor local de glucosa. Probablement una elevada activitat GK i una elevada disponibilitat de glucosa produïrien un efecte positiu sobre l'alliberament de la hormona [142, 143]. Aquesta vinculació podria explicar com la desnutrició pot ésser una causa d'infertilitat femenina.

El senyal de marcatge de GK a les cèl·lules tiotropes era inferior que a les gonadotropes, i semblaria que la presència de la GK indica que la síntesi i/o l'alliberament de determinades hormones és dependent de glucosa [142].

Fetge (hepatòcits)

Els hepatòcits parenquimals estan exclosos del grup de cèl·lules sensores de glucosa perquè no generen cap senyal neuronal o hormonal conegut durant una càrrega de glucosa. No obstant, poden existir cèl·lules sensores de glucosa a l'arbre vascular portal, les quals enviarien senyals cap al sistema nerviós central quan les concentracions de glucosa fossin superiors a les de l'artèria hepàtica [241, 242]. L'activació d'aquest "senyal portal" per glucosa sembla estar potenciat per GLP1, similarment a l'estimulació que GLP1 exerceix sobre la secreció d'insulina estimulada per glucosa a la cèl·lula β . No obstant, el paper de la GK en la generació d'aquest senyal portal roman incert.

Els hepatòcits contenen el 99.9% del total de GK del cos. No és doncs sorprenent que aquest enzim influeixi sobre el metabolisme intermediari hepàtic i l'emmagatzemament d'energia. El transport de glucosa il·limitat que permet el GLUT-2, conjuntament amb l'afinitat única de la GK per a la glucosa, permeten que les fluctuacions de la concentració plasmàtica de glucosa siguin ràpidament traduïdes en canvis en la taxa de fosforilació de glucosa dins de l'hepatòcit. La reacció de la GK controla el flux de substrats al llarg de les vies metabòliques relacionades amb la glucosa (glicòlisi hepàtica; oxidació de glucosa; cicle de les pentoses fosfat; síntesi de glicogen; síntesi de triglicèrids, fosfolípids i colesterol; glicogenòlisi i gluconeogènesi), i, per tant, la taxa metabòlica d'aquestes vies serà dependent de les fluctuacions de la glicèmia gràcies a l'activitat GK [13, 120, 144]. La relació insulina/glucagó, que està fisiològicament connectada amb un increment de la GK hepàtica, també augmenta l'efecte de la GK sobre els paràmetres esmentats.

En situació d'alimentació (és a dir, en presència d'altres concentracions de glucosa i una relació insulina/glucagó elevada) té lloc l'alliberament de la GK del complex nuclear GKRP-GK, ja que la glucosa dissocia el complex. La mobilització de la GK des del nucli al citosol també és estimulada per

la fructosa-1-fosfat, derivada de la fructosa de la dieta. Per tant, té lloc un augment ràpid de l'activitat GK al citoplasma. La glucosa-6-fosfat obtinguda per l'activitat GK és el punt de ramificació per a la xarxa metabòlica dels hepatòcits:

- 1) és convertida a piruvat i després a acetil-CoA el qual és substrat del cicle de Krebs. Això genera ATP i citrat, un intermediari crucial i un senyal metabòlic per a la síntesi de colesterol i lípids complexos.
- 2) la glucosa-6-fosfat és transformada a UDP-glucosa, que és substrat per a la síntesi de glicogen. A més, la glucosa-6-fosfat serveix com a activador al·lostèric de la glicogen sintasa i facilita la defosforilació i consegüent inactivació de la glicogen fosforilasa, de manera que activa la síntesi de glicogen. En conjunt, la insulina i la glucosa estimulen la síntesi de glicogen i inhibeixen la glicogenòlisi, mentre que el glucagó té l'efecte contrari. A més, la glucosa també dirigeix el "senyal portal", que estimula la síntesi de glicogen indirectament a través de les vies aferents i eferents del sistema nerviós central [13, 144, 241, 242].
- 3) la glucosa-6-fosfat entra a la via de les pentoses fosfat per obtenir poder reductor per a la síntesi lipídica, i per obtenir substrats per a la síntesi de nucleòtids.

En situacions post-absortives, quan baixa la glicèmia i disminueix la relació insulina/glucagó, disminueix la GK citoplasmàtica ja que retorna al nucli i, per altra banda, la disminució de la insulina provoca una aturada de la transcripció del gen de la GK. La conseqüència de la disminució de l'activitat GK és l'activació de la gluconeogènesi i de la glicogenòlisi.

Per tant, la GK capacita el fetge per a què desenvolupi el seu paper de regulador dels nivells de glicèmia perquè li permet d'adaptar el metabolisme a la producció o a la captació de glucosa segons convingui.

Com a resum d'aquest apartat (Figura 19), existeix un sistema dispers i integrat de cèl·lules que contenen GK i que interaccionen entre elles d'una manera complexa per a mantenir l'homeòstasi de glucosa. Si comencem pel fetge, el flux glicolític està estimulat per insulina i inhibit per glucagó, hormones que són secretades pel pàncrees. La secreció d'ambdues hormones està modulada per la inervació simpàtica i parasimpàtica del pàncrees. Els centres reguladors de l'*input* neruonal en la secreció d'hormones es creu que estan localitzats a l'hipotàlem, on també s'expressa la GK. A més a més, incretines (com el GLP-1) que afecten la secreció d'insulina són produïdes i alliberades per cèl·lules de l'intestí que també expressen GK.

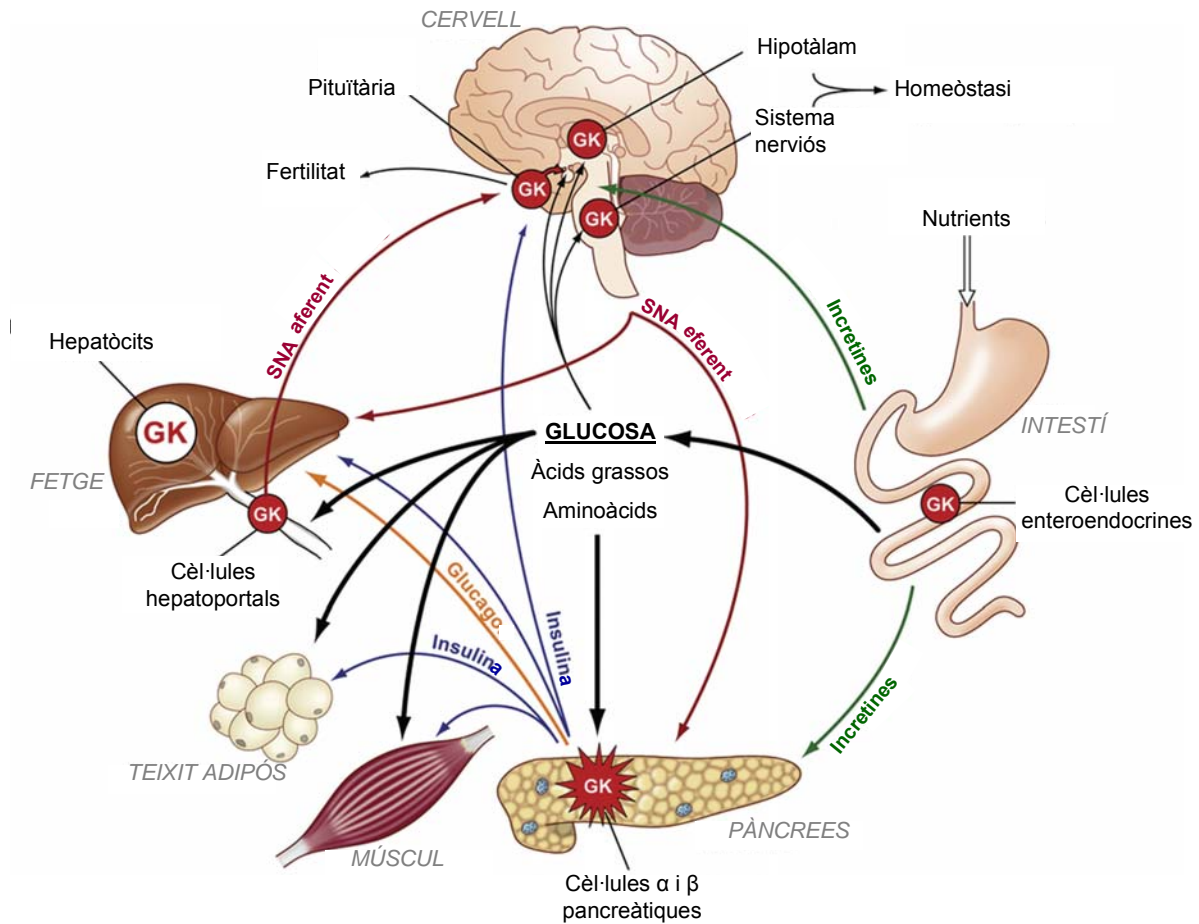


Figura 19. Diagrama de la inter-relació existent entre les cèl·lules que expressen GK i el manteniment de l'homeòstasi de glucosa. (SNA, sistema nerviós autònom) Figura adaptada de Matschinsky et al [144].

3.4 Patologia molecular de la GK

A causa del paper central de la GK en el metabolisme glucídic hepàtic i en el control neuroendocrí de la secreció d'insulina, una petita variació de l'activitat GK podria conduir a quadres hipoglicèmics o bé hiperglicèmics. Aquestes prediccions foren verificades pel descobriment de l'associació de la GK amb malalties com la PHHI (*persistent hyperinsulinemic hypoglycemia in infancy*), la MODY-2 (*maturity onset diabetes of the young-2*) i la PNDM (*permanent neonatal diabetes mellitus*) [243-250]. Aquestes patologies són degudes a mutacions en el gen de la GK: se n'han descrit unes 250 que inclouen canvis d'aminoàcid, insercions, delecions i variants de *splicing* (Figura 20) [128, 129, 251-253]. L'anàlisi bioquímica de moltes d'aquestes mutacions va revelar que comportaven defectes moleculars que repercutien en l'activitat enzimàtica de l'enzim (canvis en la constant catalítica, en l'afinitat per a la glucosa, en la cooperativitat per a la glucosa). Existeix un grup de mutacions de GK

que tenen una cinètica de GK normal, la qual cosa suggereix que provoquen alteracions en la regulació post-transcripcional, com una manca d'activació al·lostèrica, alteracions en les interaccions proteïques, inestabilitat tèrmica, disminució de la vida mitjana de l'enzim, etc.

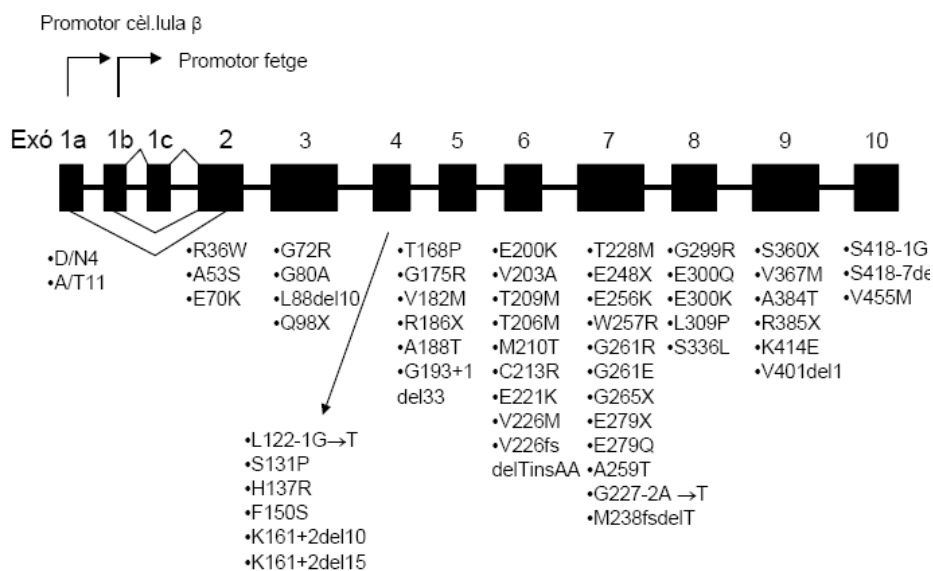


Figura 20. Representació esquemàtica del gen de la GK en el locus 7p15-p13.1 i distribució d'algunes de les mutacions descrites. (Adaptat de Gloyn *et al* [254]).

MODY-2 (*maturity onset diabetes of the young-2*)

La majoria de les mutacions descrites per a la GK són mutacions inactivadores. Quan un individu presenta un alel defectiu, que causa una inactivació de la GK, manifesta una forma familiar d'hiperglicèmia o diabetis lleu, coneguda amb el nom de MODY-2 [127, 168, 244, 251, 253, 255]. Es transmet com un tret autosòmic dominant i sovint és diagnosticada abans dels 25 anys d'edat. Clínicament, la MODY-2 fou definida com una síndrome amb alteracions de la glicèmia en dejuni o diabetis lleugera, amb hiperglicèmia mantinguda a nivells estables durant anys, amb poca propensió a complicacions neurovasculars i que es pot controlar sense teràpia farmacològica.

Investigacions clíniques en pacients de MODY-2 van revelar desordres en el metabolisme hepàtic: la síntesi neta de glicogen estava disminuïda en un 50% en comparació amb els individus sans, i no presentaven supressió de la producció hepàtica de glucosa en resposta a la hiperglicèmia. També tenien desordres en la funció de l'illot pancreàtic: malgrat tenir elevades concentracions de glucosa en sang, els nivells d'insulina es mantien baixos o comparables als dels individus sans, fet que és compatible amb la pèrdua de sensibilitat de la cèl·lula β a la glucosa [256-261].

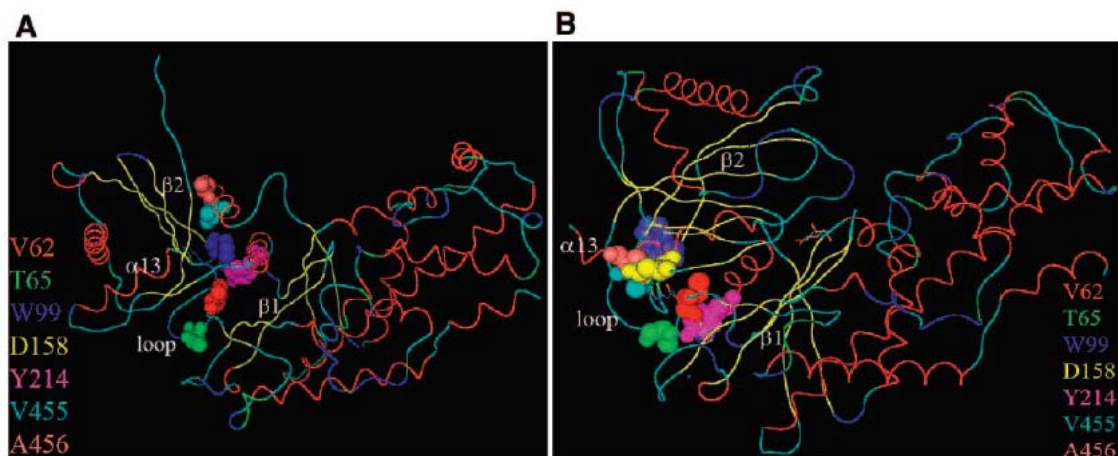
PNDM (*permanent neonatal diabetes mellitus*)

Aquesta patologia es desenvolupa en nounats que tenen els dos alels de GK alterats per mutacions inactivadores. Es manifesta com a una diabetis permanent molt severa, que compromet la supervivència i que requereix un tractament d'administració d'insulina intensiu i crònic [249, 250].

PHHI (*persistent hyperinsulinemic hypoglycemia in infancy*)

Les mutacions que provoquen una activació de la GK causen una síndrome caracteritzada per glicèmies baixes cròniques i hiperinsulinèmia, coneguda amb el nom de PHHI. Es transmet de forma autosòmica dominant i només se'n coneixen casos d'heterozigosi. És una malaltia clínicament heterogènia, incloent quadres d'hipoglicèmies severes que requereixen pancreatectomies totals com a tractament, i també quadres d'hipoglicèmies que poden ésser controlades amb drogues que inhibeixen l'alliberament d'insulina. Estudis cinètics d'aquests mutants de GK van revelar un increment en l'afinitat de la glucosa, amb o sense un increment del nombre de recanvi (K_{cat}). A les cèl·lules β , l'activació de la GK comporta que es secreti insulina fins i tot quan les concentracions de glucosa en sang són baixes, és a dir, disminueix el llindar de la secreció d'insulina estimulada per glucosa (GSIR) [122, 245, 248, 262-264].

El més sorprenent és que totes les mutacions activadores de la GK es localitzen en una regió determinada de l'enzim [144], concretament a la zona connectora entre els dos dominis de la GK, al putatiu lloc al·lostèric (on s'uneixen els GKAs) [136] (Figura 21). Per aquest motiu l'estudi d'aquests mutants és rellevant per al desenvolupament dels GKAs. La localització de les mutacions activadores a la regió connectora de la GK comporta l'estabilització de l'enzim en la conformació tancada. Aquest fet explica l'augment d'afinitat per a la glucosa i també possibilita alteracions en la interacció amb la GKRP [262, 264].



En conjunt, el fet que alteracions en la GK comportin l'aparició de malaltia corrobora el fort control que la GK exerceix sobre l'homeòstasi de glucosa. No obstant, la informació que en tenim és parcial, ja que pràcticament tots els estudis s'han centrat en els efectes de les mutacions a la cèl·lula β i al fetge, sense considerar la resta de teixits on també s'expressa la GK.

3.5 Estudis en models animals

Donat que la GK s'expressa al fetge, pàncrees, cervell i intestí (teixits que juguen un paper central i que interactuen per controlar la glicèmia) i donat també que la regulació de l'activitat GK és complexa, la comprensió plena de com les mutacions d'aquest enzim causen hiperglicèmia o hipoglicèmia només pot ésser assolida en models animals, no en experiments *in vitro*.

A. Genosupressió de la GK

- Genosupressió total de la GK

Existeixen tres treballs en què s'elimina l'expressió de la GK [135, 265, 266]. En tots els casos, es posa de manifest que els animals *knock-out* de la GK moren o durant la gestació o a pocs dies després del naixement de profunda hiperglicèmia. En el cas dels ratolins que sobreviuen fins a 4 dies, es va poder realitzar una anàlisi metabòlica que revelà esteatosi hepàtica i la disminució dels nivells de glicogen hepàtic (és un fenotip similar a l'observat en animals que tenen mutacions en el gen de la insulina) [266]. La restitució de l'expressió de la GK a les cèl·lules β d'aquests animals *knock-out* és suficient per garantir la supervivència d'aquests animals [135]. Per tant, tot indica que la manca d'insulina seria la causa principal de la letalitat en els *knock-out* de GK.

En tots els casos, els ratolins heterozigots sobreviuen però eren hiperglicèmics, ja que tenien afectada la secreció d'insulina en resposta a glucosa. Per tant, són un bon model per a la MODY-2.

- Genosupressió de la GK específicament a la cèl·lula β pancreàtica

Amb el coneixement actual dels teixits on s'expressa la GK, cal considerar prèviament si els models existents de *knock-out* de GK són específics de la cèl·lula β . Per una banda existeix l'estudi de Terauchi *et al* que van generar la genosupressió de la GK mitjançant la disrupció de l'exó específic de la forma neuroendocrina de la GK [267]. Per tant, en aquest model se suposa que la GK està disrupcionada a totes les cèl·lules neuroendocrines. Per altra banda, Postic *et al* van generar un

model induïble de transgènesi (sistema cre-loxP), amb el gen de la GK flanquejat per seqüències loxP i el Cre sota el control del promotor d'insulina [131, 266]. Per tant, com que la insulina només s'expressa a les cèl·lules β , és un model específic de cèl·lula β pancreàtica.

En els dos casos, el fenotip observat és molt semblant al que s'obté amb la gensupressió total de la GK, ja que els ratolins morien de diabetis severa pocs dies després de néixer per defectes profunds en la secreció d'insulina. Paral·lelament als *knock-out* totals, la gensupressió a la cèl·lula β també causava esteatosi hepàtica i una disminució del contingut de glicogen al fetge com a conseqüència de la disminució de la insulinèmia. En conclusió, es torna a posar de manifest la importància que té la GK pancreàtica com a reguladora de la insulinèmia per tal de garantir la supervivència.

- Gensupressió de la GK específicament al fetge

L'únic model de *knock-out* de GK al fetge que existeix s'obtingué amb el sistema LoxP-Cre, amb Cre sota el control del promotor de l'albumina [131, 266]. Sorprenentment, els homozigots van viure fins a l'edat adulta sense GK al fetge i presentaven poques alteracions sobre el metabolisme glucídic en estat basal: hiperglicèmia lleugera, sense augment d'insulinèmia i sense canvis en els nivells de glicogen ni d'altres metabòlits sanguinis i hepàtics. Un *knock-out* de GLUT-2 tenia un fenotip molt més sever, suggerint que la manca de GK al fetge està compensada per les altres HK.

Només en estudis de clampatge hiperglicèmic s'observà una disminució en la captació de glucosa i en la síntesi hepàtica de glicogen i, per altra banda, certs gens que responen a glucosa no estaven regulats apropiadament (L-PK, PEPCK). Curiosament, durant el clampatge s'observaren alteracions en la secreció d'insulina. Una explicació d'aquest últim fet seria que la GK hepàtica és necessària per a la funció d'algun *loop* regulador neural o per a la secreció d'algun altre factor modulador de la secreció d'insulina; o bé, podria ésser degut a què les cèl·lules β pancreàtiques estan malmeses per una hiperglicèmia crònica i una sobrestimulació secretòria.

Encara que el fenotip del *knock-out* hepàtic de GK sigui lleu, posa en evidència que la GK juga un paper directe important en determinar la utilització de glucosa hepàtica durant la hiperglicèmia, a més que permet la inducció d'altres gens hepàtics que responen a glucosa. Per altra banda, la GK hepàtica també té un efecte indirecte sobre la secreció d'insulina.

Es pot concloure que el *knock-out* de GK hepàtica té efectes moderats sobre la homeòstasi de la glucosa, en contrast amb els efectes devastadors observats en el *knock-out* de GK pancreàtica. Aquesta comparació és una il·lustració potent de la diferència entre el paper de la GK en cèl·lules sensores de glucosa i el seu paper en cèl·lules emmagatzemadores de glúcids.

B. Sobreexpressió de la GK

- SOBREPRESSIÓ GLOBAL DE LA GK

Transgènics amb una còpia extra del gen sencer de la GK (amb els 2 promotors, tots els exons i una gran quantitat de la seqüència de DNA flanquejant) presentaven una disminució de la glicèmia de l'ordre del 25 % en comparació amb els controls [132, 133, 268]. En condicions basals, presentaven una major captació de glucosa sense variacions en la insulinèmia. En sotmetre'ls a un estudi de clampatge hiperglicèmic, destacà que les taxes de captació i de recanvi de glucosa eren semblants als controls però secretaven un 50 % menys d'insulina. Tot i tenir menys insulina, presentaven un major contingut hepàtic de glicogen 2 hores després del clampatge. Curiosament aquests animals tenien una disminució de la GK a l'illot pancreàtic, probablement com a conseqüència de la hipoglicèmia que conduiria a una disminució de l'estabilitat de la GK pancreàtica. Per tant, semblaria que el fetge té un paper dominant en mantenir les concentracions de glucosa plasmàtiques.

En sotmetre'ls a una dieta rica en greixos, aquests transgènics estaven protegits davant el desenvolupament d'hiperinsulinèmia i hiperglicèmia, encara que fossin igual d'obesos que els controls [269]. Aquest fet suggereix que l'augment de l'activitat GK pot ésser una estratègia efectiva per tractar la diabetis de tipus 2.

- SOBREPRESSIÓ DE LA GK AL FETGE

Durant els darrers 20 anys diversos grups han desenvolupat estudis de sobreexpressió de GK exclusivament al fetge. Donada la gran diversitat de models emprats i la variabilitat en les condicions d'estudi (alimentació, dejuni, animals sans, animals diabètics, etc.), a continuació es presentaran aquests treballs agrupats segons la situació fisiològica de l'anàlisi per tal de facilitar les comparacions entre ells. En aquest capítol es tractaran els models de sobreexpressió en animals sans per obtenir més informació sobre el paper fisiològic de la GK hepàtica. (En el capítol següent, es tractaran els models de sobreexpressió hepàtica de la GK com a possible teràpia de la diabetis.)

a) estudis en animals sans i alimentats

Dos laboratoris independents han realitzat aquest tipus d'estudis que han estat presentats en diverses publicacions [116, 117, 134, 270, 271], els resultats de les quals es resumeixen a la Taula 6.

Estudi:	Ferre <i>et al</i>		O'Doherty <i>et al</i>	
Referències	[116, 134]	[117]	[270]	[271]
Model animal:				
- Espècie	<i>Mus musculus</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>R. norvegicus</i>
- Pes/Edat inicial	4-8 setmanes	4-8 setmanes	200-225 g	200-225 g
- Transf. gènica	transgènic	transgènic	Ad + immsup	Ad + immsup
- Espècie transgen	GK de rata	GK de rata	GK de rata	GK de rata
- Promotor	PEPCK-C	PEPCK-C	CMV	CMV
- Temps anàlisi		2 / 12 mesos	4-5 dies post-infecció	4-5 dies
- Nivells transgen	x2 (activitat)	x2 (activitat)	x3 / x6.4 (activitat)	x3 (activitat)
Metabòlits sang:				
- glucosa	↓	-	=	↓
- lactat	-	-	↑	↑
- triglicèrids	~↑	-	~↑	↑
- àcids grassos	~↑	-	=	↑
- β-hidroxibutirat	~↓	-	=	↑
Hormones en sang:				
- insulina	↓	-	=	↓
Metabòlits fetge:				
- glucosa-6-fosfat	↑	↑	-	-
- glicogen	↑	↑	=	=
- lactat	↑	-	-	-
- triglicèrids	-	=	-	-
Enzims i factors de transcripció hepàtics:	↑ L-PK ↓ PEPCK-C ↓ GLUT-2 ↓ TAT			↑ L-PK ↑ ACC1 ↑ FAS ↑ Aldolasa B ↑ glc-6-pasa = PEPCK-C

Taula 6. Estudis de sobreexpressió hepàtica de GK en models animals sans i analitzats en estat d'alimentació. "CMV" significa citomegalovirus; "Ad + immunosup", adenovirus amb tractament immunosupressor (ciclosporina A i prednisona); "(activitat)", els nivells de transgen s'han determinat per nivells d'activitat GK en comparació amb els grups control; "↓", disminució significativa; "↑", augment significatiu; "~↓" i "~↑", tendència a la disminució o a l'augment, respectivament; "=" sense variació respecte els controls; "-" no determinat. En negreta es mostren els criteris de divisió de la columna corresponent.

Aquests estudis posen de manifest que en potenciar la captació de glucosa al fetge com a resultat de la sobreexpressió de la GK, té lloc una disminució en la glicèmia. Ara bé, tal i com mostra O'Doherty *et al*, semblaria que l'efecte sobre la glicèmia és dosi-dependent, ja que només n'assoleixen la disminució amb dosis altes del transgen [270].

Pel què fa al fetge, el destí de la glucosa-6-fosfat produïda per la GK pot variar segons l'estat energètic de la cèl·lula. La glucosa és oxidada fins a CO₂ quan es requereix energia. No obstant, en estat d'alimentació, quan hi ha gran disponibilitat de glúcids a l'hepatòcit, el citrat i l'ATP produïts pel cicle de Krebs i per la cadena respiratòria s'acumulen al citoplasma on inhibeixen la glicòlisi. La glucosa és aleshores convertida en glicogen o en triglicèrids, els quals seran usats com a font energètica durant el dejuni o durant l'exercici o quan sigui necessari. Consistentment, Ferre *et al*

observen un increment en el contingut hepàtic de glucosa-6-fosfat, de glicogen i de lactat [116, 117, 134]. Però, O'Doherty *et al* no observen variacions en el contingut de glicogen hepàtic, independentment de la dosi de GK transfectada [270]. Per justificar-ho suggereixen que poden existir limitacions intrínseques per a la síntesi de glicogen, de manera que l'efecte hipoglucemiàtic observat seria degut sobretot a un increment de la utilització de glucosa i no a un increment de l'emmagatzematge de glucosa.

La glucosa i la insulina són els senyals principals per a la inducció de la funció "tamponadora" del fetge després de la ingesta. Però ambdós senyals estan interconnectats: la glucosa indueix la secreció d'insulina i la insulina indueix la captació de glucosa. Quan hi ha una disminució de la glicèmia com a conseqüència de la sobreexpressió hepàtica de la GK, la secreció d'insulina està inhibida i, com a resultat, els models animals de sobreexpressió de GK tenen menors nivells d'insulinèmia que els controls [116, 117, 270, 271]. En aquesta línia, O'Doherty *et al* només observen una disminució en la insulinèmia quan hi ha un efecte en la glicèmia usant altes dosis de transgen [270].

L'increment de l'activitat GK al fetge activa la senyalització de glucosa i afecta l'expressió dels gens que responen a glucosa: augmenta la L-PK, però en estat d'alimentació els efectes sobre el gen de la PEPCK-C no són rellevants (en l'estudi de Ferre *et al*, observen una disminució del mRNA de PEPCK-C però no canvien els nivells d'activitat PEPCK-C).

Com que el metabolisme glucídic i el lipídic estan interconnectats, l'increment del metabolisme de glucosa també afecta el patró lipídic. Sembla que la sobreexpressió hepàtica de GK condueix a un increment dels nivells de TAG sanguinis [116, 117, 270, 271]; però existeixen discrepàncies pel que fa als àcids grassos lliures i el β -hidroxibutirat. En l'estudi d'O'Doherty, existeix un increment d'àcids grassos lliures en sang i de β -hidroxibutirat només quan s'empren altes dosis del transgen [270]. Es podria justificar amb la disminució dels nivells d'insulina obtinguts amb les dosis elevades de transgen: l'increment d'àcids grassos lliures seria degut a la manca d'inhibició per insulina de la lipòlisi al teixit adipós.

Al fetge, l'increment del flux de glucosa com a conseqüència de la sobreexpressió de GK pot incrementar les concentracions de glicerol-3-fosfat i malonil-CoA. El malonil-CoA serveix com a substrat per a la lipogènesi *de novo* i com a inhibidor de la carnitina-palmitoil transferasa 1, de manera que disminueix el transport d'àcids grassos de cadena llarga al mitocondri per a ésser oxidats. Per tant, augmentaria la síntesi de TAG i disminuiria el contingut de β -hidroxibutirat (fruit de la inhibició de la β -oxidació). Aquesta hipòtesi es compleix en el model de Ferre *et al*, malgrat que l'increment del contingut hepàtic de TAG només s'observa en els animals més vells que presenten certa resistència a insulina [117]. En el cas de O'Doherty *et al*, es justifica l'increment dels lípids sèrics com a conseqüència de la inducció de l'expressió de gens lipogènics (ACC1, FAS) [271]. No obstant aquests animals tenen un increment inexplicable dels nivells de β -hidroxibutirat circulant.

Per tant, s'observen discrepàncies entre els dos estudis sobretot pel què fa a l'impacte de la sobreexpressió de la GK sobre el metabolisme lipídic. Aquestes diferències poden ésser degudes a diferents possibilitats: a) que la sobreexpressió de GK en el fetge de ratolí pot ésser més efectiva en estimular el metabolisme de glucosa que els mateixos nivells de sobreexpressió en un animal més gran. b) una segona possibilitat és que al model de Ferre *et al* usen un promotor de PEPCK-C que dirigeix el transgen principalment a la zona periportal del fetge i, a més, l'expressió serà induïda quan hi hagi una relació insulina/glucagó baixa (no s'ajusta al patró fisiològic temporal ni posicional d'expressió de la GK), mentre que l'expressió de GK dirigida per adenovirus pot afectar diferents poblacions d'hepatòcits amb una eficiència diferent,. c) Els animals transgènics que sobreexpressen la GK al llarg del procés embrionari i durant tota la vida possiblement adopten canvis compensatoris en la secreció d'insulina, en l'acció de la insulina, o altres variables metabòliques que no tenen lloc en una manipulació aguda de la GK via transferència adenovírica.

Per altra banda, en un altre model de transgènic que sobreexpressa la GK al fetge no es detectà una activitat GK significativament superior que els controls, ni cap efecte fenotípic, en estat d'alimentació [118].

b) estudis en animals sans i dejunats

A la Taula 7 es recullen els resultats dels estudis en què es sobreexpressa la GK al fetge d'animals sans i analitzats en estat de dejuni.

En estat de dejuni, la majoria d'estudis no observen canvis en la glicèmia [117, 270-272], excepte el cas del transgènic de Hariharan *et al* [118]. En aquest cas, la baixada de glicèmia va acompanyada d'una disminució de la insulinèmia, la qual podria explicar la disminució del lactat sèric i l'increment dels àcids grassos sèrics (per disminució de la glicòlisi i producció de lactat al múscul, i per manca d'inhibició de la lipòlisi al teixit adipós). No obstant, O'Doherty *et al* reporten una reducció del lactat sèric sense observar ni una disminució en la glicèmia ni en la insulinèmia [270].

El més destacat d'aquests estudis és que, en analitzar els ratolins que sobreexpressen la GK al fetge a llarg termini, s'observa un increment de la insulinèmia compatible amb un estat d'intolerància a la glucosa i resistència a la insulina [117, 272]. Però de nou, l'estudi de Hariharan *et al* es diferencia de la resta perquè no observen variacions d'insulinèmia en ratolins de més de 20 setmanes d'edat, ni cap senyal que indiqui alteracions en la tolerància a la glucosa [118].

Pel què fa al fetge, s'observa un increment del contingut de glicogen en els dos estudis que el determinen [117, 270], excepte en els ratolins d'edat avançada que presenten resistència a insulina [117].

Estudi	Hariharan <i>et al</i>	Desai <i>et al</i>	Ferre <i>et al</i>		O'Doherty <i>et al</i>	
Referències	[118]	[272]	[117]		[270]	[271]
Model animal:						
- Espècie	<i>M.musculus</i>	<i>M.musculus</i>	<i>M.musculus</i>		<i>Rattus n.</i>	<i>Rattus n.</i>
- Pes/Edat inicial		4 mesos	4-8 setmanes		200-225 g	200-225 g
- Transf. gènica	transgènic	adenovirus	transgènic		Ad + im	Ad + im
- Espècie transgen	GK humana	GK humana	GK de rata		GK de rata	GK de rata
- Promotor	apoAI-SV40	RSV	PEPCK-C		CMV	CMV
- Temps anàlisi	5 setmanes	3 / 12 set.	2 / 12 mesos		4-5 dies	4-5 dies
- Nivells transgen	x5	x1.5	x2		x2.1	x3
- Hores dejuni	16 hores	nit	16 hores		18 hores	18 hores
Metabòlits sang:						
- glucosa	↓	=	-	-	=	
- lactat	↓	=	-	-	~↓	
- triglicèrids	=	=	=	↑	↑	
- àcids grassos	~↑	=	-	-	=	
- β-hidroxitirac	-	-	-	-	=	
Hormones en sang:						
- insulina	↓	↓ / ↑	↑	↑	=	
Metabòlits fetge:						
- glucosa-6-fosfat			↑	~↑	-	
- glicogen			↑	=	↑	
- lactat			-	-	-	
- triglicèrids			=	↑	-	
Enzims i factors de transcripció hepàtics:						↑ L-PK ↑ ACC1 ↑ aldolasa ↑ glc6pasa = PEPCK-C = PFK-2 = glc6pDH

Taula 7. Estudis de sobreexpressió hepàtica de GK en models animals sans i analitzats en estat de dejuni. "RSV" significa Rous sarcoma virus; "Ad + im", adenovirus amb tractament immunosupressor (ciclosporina A i prednisona); "x5", els nivells de transgen s'han determinat per nivells d'activitat GK en comparació amb els grups control; "↓", disminució significativa; "↑", augment significatiu; "~↓" i "~↑", tendència a la disminució o a l'augment, respectivament; "=" sense variació respecte els controls; "-" no determinat. En negreta es mostren els criteris de divisió de la columna corresponent.

En relació al metabolisme lipídic, Ferre *et al* observen un increment en el contingut hepàtic de triglicèrids i també un increment dels triglicèrids sèrics, fàcilment justificable per un increment del metabolisme de glucosa que implica un augment dels nivells de malonil-CoA (substrat de la lipogènesi i inhibidor de l'oxidació d'àcids grassos) [117] que comportaria un increment de la secreció de VLDL a la sang.

La discrepància principal és l'efecte a llarg termini de la sobreexpressió de GK en el model de transgènic de Hariharan *et al* i el transgènic de Ferre *et al* [117, 118]. En el primer cas, els ratolins de 20 setmanes presentaven un pes i un índex de massa corporal significativament inferiors als controls. Ho justificaven per un efecte de la baixa glicèmia i insulinèmia sobre els adipòcits, el qual conduïa a una disminució de la lipòlisi, una disminució de la massa de teixit adipós i un increment de la

utilització d'àcids grassos a la perifèria. Era improbable que la disminució en l'índex de massa corporal fos degut a la degradació de proteïnes musculars ja que aquests animals transgènics eren sans, fèrtils i sense desgast muscular apreciable. En el segon cas, s'observava una tendència a incrementar la insulina i el pes, com en un model d'inducció de diabetis de tipus 2 lligada a l'obesitat. De nou, cal considerar que en aquest model de transgènesi el gen de la GK estava dirigit pel promotor de la PEPCK-C i, per tant, l'expressió de la GK seria periportal i en dejuni, condicions que no s'ajusten al patró fisiològic per a la GK.

En conjunt, tots els estudis en models animals han demostrat que l'eliminació total de la GK és incompatible amb la vida perquè les cries morien pels efectes causats per una hiperglicèmia incontrolada. Si es redueix la quantitat de GK a la meitat, s'obtenia un fenotip d'hiperglicèmia pronunciada. En contrast, els animals amb un 50 % d'increment en la GK patien hipoglicèmia. Aquestes dades posen de manifest que petits canvis en l'expressió de GK són suficients per tenir un impacte en la concentració plasmàtica de glucosa.

No obstant, la sobreexpressió exclusivament hepàtica de la GK no generà un fenotip general comú entre els diversos treballs analitzats, possiblement perquè deuen existir variables que influeixen en els efectes de la sobreexpressió (com per exemple: localització del transgen en el parènquima hepàtic, regulació temporal de l'expressió del transgen, nivells de transgen assolits relacionats amb llindars necessaris per activar o inhibir determinades vies metabòliques i/o de senyalització, espècie del model animal, efectes sobre la insulinèmia, etc.).

Per concloure aquest capítol, les mutacions del gen de la GK i l'associació a malalties relacionades amb el metabolisme glucídic, conjuntament amb les anàlisis dels models animals de GK, demostren que canvis en l'activitat neta de GK provoquen canvis en la concentració sanguínia de glucosa. Aquest efecte reforça el concepte de la GK com a sensor de glucosa i destaca l'elevada força de control metabòlic que la GK exerceix en l'organisme.

4. DIABETIS MELLITUS

La diabetis mellitus és una malaltia d'etiologia múltiple caracteritzada per la incapacitat de l'organisme de mantenir la homeòstasi de glucosa com a conseqüència, bé de la incapacitat del pàncrees per a secretar insulina (diabetis de tipus 1), o de la incapacitat dels teixits perifèrics com el múscul, fetge i teixit adipós, de respondre a la hormona (diabetis de tipus 2). La hiperglucèmia és el desordre més important associat a la diabetis, essent el responsable últim de les conseqüències patològiques de la malaltia. Totes les formes de diabetis es caracteritzen pel desenvolupament de complicacions secundàries que van des de patologia microvascular en la retina i el ronyó fins a complicacions neurològiques a nivell perifèric, passant per un risc incrementat de patir arteriosclerosi o malaltia cerebro-vascular i vascular perifèrica, o fins i tot mortalitat per infart de miocardi. Actualment, entre un 3 i un 5% de la població dels països occidentalitzats pateix aquesta malaltia i es preveu que s'hagi doblat en el 2025, en part, degut al dramàtic increment en la incidència de la obesitat, factor que correlaciona amb el desenvolupament de resistència a insulina i diabetis de tipus 2 [273, 274].

4.1 PATOFISIOLOGIA DE LA DIABETIS MELLITUS

A. DIABETIS DE TIPUS 1

La diabetis de tipus 1 (diabetis mellitus dependent d'insulina) es manifesta generalment abans dels 30 anys d'edat, freqüentment durant l'adolescència i afecta entre el 5 i el 10% de la població diabètica. Es tracta d'una malaltia autoimmunitària en què el sistema immunitari ataca i destrueix les cèl·lules β del pàncrees les quals són productores d'insulina. L'aparició de la malaltia depèn tant de factors genètics que hi predisposin (per exemple, alguns al·lels del complex HLA) com de factors ambientals (alguna infecció vírica, dieta, toxines, estrès...) [275, 276]. Aquest fet es certifica amb les dades d'un 30-50 % de concordança en bessons monozigòtics.

La pèrdua de les cèl·lules β condueix a la manca d'insulina que es manifesta en hiperglicèmia i cetoacidosi. El quadre metabòlic d'un diabètic de tipus 1 no tractat és d'un estat catabòlic perpetu, és a dir, de degradació de reserves de combustible i dels teixits. L'absència d'insulina redueix la captació i la metabolització de glucosa per part del fetge i dels teixits perifèrics sensibles a la insulina (teixit adipós, múscul), la qual cosa incrementa els nivells de glucosa en sang. Per altra banda, els alts

nivells de glucagó estimulen les vies de producció hepàtica de glucosa (gluconeogènesi i glicogenòlisi) que encara contribueixen més a la hiperglicèmia. Al teixit adipós la lipòlisi no està inhibida a causa de la manca d'insulina, fet que fa incrementar els nivells d'àcids grassos circulants. Aquests són captats i oxidats al fetge per a generar cossos cetònics, donant lloc a la cetoacidosi característica de la malaltia. Aquests cossos cetònics seran utilitzats com a substrat energètic alternatiu a la glucosa pels teixits perifèrics (múscul, cervell, etc). Aquest quadre metabòlic comporta que els símptomes característics de la malaltia siguin la polifàgia (increment de la ingesta), poliúria (diüresi osmòtica) i polidípsia (increment de la set), acompanyats de pèrdua de pes.

En el desenvolupament de la diabetis de tipus 1 es poden distingir dues fases ben diferenciades: 1) insulinitis, quan una barreja de macròfags i limfòcits T autoagressius contra antígens de la cèl·lula β s'infiltra en els illots pancreàtics. 2) diabetis, quan la major part de les cèl·lules β han estat destruïdes i no hi ha prou producció d'insulina per regular els nivells de glicèmia [277]. Les cèl·lules α , productores de glucagó, les δ , productores de somatostatina i les PP, productores de polipèptid pancreàtic, es preserven.

B. DIABETIS DE TIPUS 2

La diabetis de tipus 2 és la forma de diabetis més comuna, amb una incidència del 90 al 95% en la població diabètica. Es manifesta en individus adults, generalment majors de 40 anys. No es caracteritza per una manca d'insulina, si més no en els estadis inicials, sinó per la incapacitat de l'hormona d'actuar eficientment en teixits diana com el múscul, el fetge o el teixit adipós (resistència a insulina), juntament amb un defecte en la secreció de la insulina. La conseqüència de la manca d'acció de la insulina és la hiperglicèmia perquè: 1) la captació de glucosa al múscul i al fetge està dificultada, 2) no hi ha inhibició de la producció de glucosa al teixit hepàtic i 3) hi ha alteracions en la captació i reesterificació d'àcids grassos al teixit adipós.

Es tracta d'una malaltia multigènica, la qual cosa dificulta la identificació dels al·lells lligats al seu desenvolupament. També existeixen factors ambientals que intervenen en l'aparició de la malaltia, principalment el sedentarisme i una alimentació inadequada. Les persones amb diabetis de tipus 2 acostumen a patir sobrepès i/o obesitat (sobretot en les cultures occidentals) i manifesten l'anomenada síndrome metabòlica caracteritzada per resistència a insulina, diabetis, hipertensió i hipertrigliceridèmia. La relació entre obesitat i resistència a insulina sembla ésser deguda a l'activació crònica de les vies inflamatòries en els pacients obesos, la qual afectaria la senyalització de la insulina a nivell dels teixits perifèrics i del sistema nerviós central [278].

Tot i que la patogènesi de la diabetis de tipus 2 es coneix poc, la majoria d'investigadors coincideixen en què la resistència a insulina és l'element principal en el seu desenvolupament. Aquesta conclusió

es basa en les següents observacions: a) els pacients amb diabetis de tipus 2 presenten resistència a insulina [279, 280]; b) la resistència a insulina és un bon marcador del futur desenvolupament de la diabetis tipus 2 [280, 281] i c) es pot prevenir la diabetis de tipus 2 amb agents sensibilitzants a la insulina [282, 283]. En les etapes inicials de la malaltia, les cèl·lules β incrementen la secreció d'insulina per compensar la resistència a la hormona als teixits perifèrics i mantenir l'euglicèmia. Amb el pas del temps, apareix una disfunció de les cèl·lules β que condueix a una deficiència relativa o absoluta d'insulina i, en conseqüència, hiperglicèmia i diabetis oberta [284, 285]. Per tant, la disfunció de la cèl·lula β és una condició *sine qua non* per a l'estat diabètic però no la causa primària de la malaltia [286]. En resum, la diabetis tipus 2 és un desordre metabòlic complex causat per 2 defectes fisiològics principals: la resistència a l'acció de la insulina combinada amb una deficiència en la secreció d'insulina.

Les causes moleculars desencadenants de la resistència a la insulina en els teixits perifèrics són diverses i només es coneixen parcialment. És difícil determinar quins defectes són primaris i quins conseqüències secundàries. L'alteració en el número de receptors, mutacions puntuals que afectin a l'afinitat de la hormona pel receptor, alteracions de la via de transducció de la senyal d'insulina o dels mecanismes de captació i utilització de la glucosa són possibles factors determinants de la resistència a insulina. També hi poden afectar altres elements com la hiperinsulinèmia, hiperglicèmia, adipocines o citocines, però sobretot l'increment en sang dels àcids grassos lliures [287-290] (Figura 22).

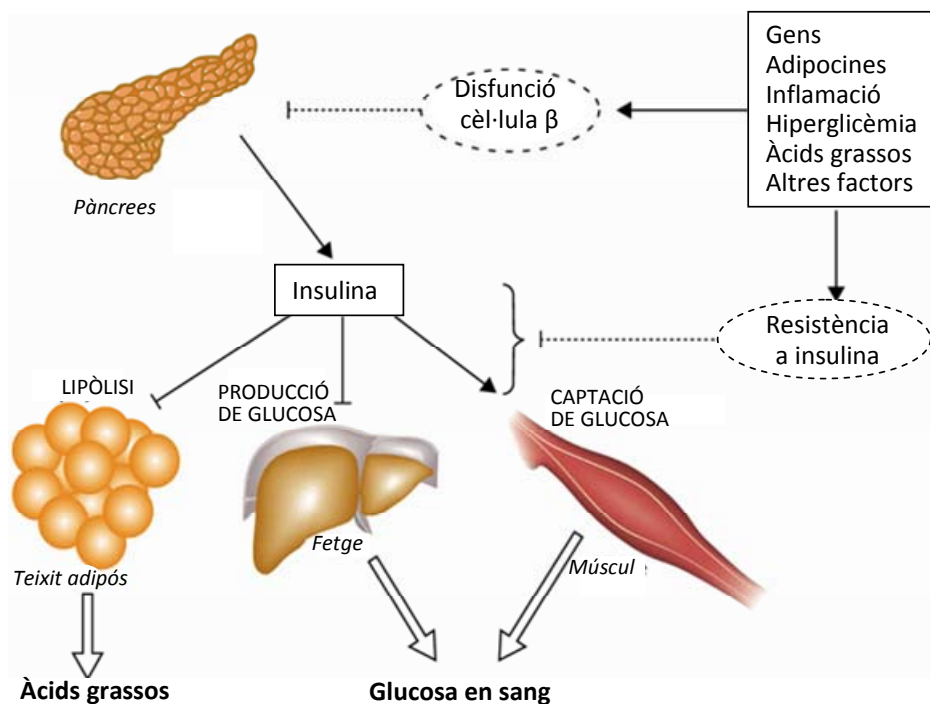


Figura 22. Patofisiologia de la hiperglicèmia i l'increment d'àcids grassos lliures circulants en la diabetis de tipus 2. (Adaptat de Stumvoll *et al* [291]).

Com ja s'ha esmentat, els principals òrgans afectats per la resistència a insulina són el teixit adipós, el múscul i el fetge; tot i que la contribució específica de cada òrgan a la hiperglicèmia no està clara. L'ús de models animals genosuprimits amb alteracions específiques de teixit ha permès dissecionar les contribucions individuals dels òrgans sensibles a insulina en la patogènia diabètica:

- **teixit adipós:** tot i que contribueix només en un 5% en l'aclarament de glucosa postpandrial, és important per al manteniment de la glicèmia i la sensibilitat a insulina dels altres teixits perifèrics. Així es posà de manifest amb l'estudi de ratolins *knock-out* pel transportador de glucosa GLUT-4 al teixit adipós, els quals presentaven incapacitat per captar glucosa al teixit adipós i resistència a insulina al múscul i al teixit adipós [292]. Als adipòcits, la resistència a insulina incrementa l'activitat de la lipasa sensible a hormones (LSH), resultant en un increment de la taxa de lipòlisi i alliberament d'àcids grassos i glicerol. L'increment de la concentració d'àcids grassos en sang és un factor associat a la resistència a insulina tant al múscul com al fetge i a la esteatosi hepàtica; mentre que el glicerol és un substrat gluconeogènic pel fetge. Per altra banda, el fet que el teixit adipós actui també com a teixit endocrí pot implicar una desregulació de la secreció de les adipocines implicades en la regulació de l'homeòstasi energètica i en la inflamació (leptina, adiponectina, resistina, TNF- α , IL-6, etc.), i aquesta desregulació pot exercir efectes importants sobre l'acció de la insulina al fetge i al múscul.
- **múscul:** és responsable de la captació de fins a un 75% de la glucosa circulant en estat postabsortiu. En estats de resistència a insulina, la captació de glucosa post-pandrial per part del múscul esquelètic es veu compromesa ja que el transport (mediat pel transportador de glucosa GLUT-4) i fosforilació de glucosa al múscul (reacció catalitzada per la hexocinasa, HK-2) són mecanismes depenents d'insulina. La importància relativa de la senyalització de la insulina al múscul ha estat també valorada en models de ratolins *knock-out*. Per exemple, els ratolins genosuprimits per al receptor de la insulina en múscul no presenten alteracions en la homeòstasi de la glucosa [293]. En canvi, la seva delecció en múscul i teixit adipós provoca certa hiperinsulinèmia, resistència a insulina i intolerància a glucosa, però sense arribar a desenvolupar el fenotip diabètic [294]. S'ha suggerit que efectes compensatoris en la captació de glucosa per part del teixit adipós [295] o un *bypass* de la senyalització de la insulina a través del receptor de IGF1, amb el qual el receptor de la insulina comparteix gran homologia, podrien explicar l'absència de fenotip diabètic en els ratolins *knock-out* pel receptor de la insulina al múscul. Aquests resultats no posen en dubte la importància de la captació de glucosa postpandrial pel múscul per al manteniment de la homeòstasi de la glucosa, sinó que fan palès el paper essencial del teixit adipós en la resistència a insulina. La resistència a la insulina en múscul i teixit adipós precedeix l'inici de la diabetis oberta.

- **fetge:** la resistència a insulina al fetge té dues conseqüències: sobreproducció de glucosa hepàtica i dislipidèmia hepàtica. Pel què fa a la sobreproducció de glucosa, nombrosos estudis han evidenciat el pes específic de la producció hepàtica de glucosa en la hiperglicèmia diabètica. Per altra banda, els estudis en ratolins genosuprimits per al receptor de la insulina en fetge pateixen una profunda resistència a la insulina perifèrica i hepàtica (incapacitat de supressió de la producció de glucosa) i intolerància a la glucosa [296]. Aquests estudis demostren la importància del fetge com a òrgan central en el control de la homeòstasi de la glucosa a nivell sistèmic a través dels circuits neuronals que comuniquen el fetge amb l'hipotàlem a través del nervi vague.

La captació d'àcids grassos pel fetge és un procés no regulat i, per tant, proporcional a la concentració en sang dels mateixos. Els àcids grassos afecten directament la sensibilitat a insulina del fetge impedit-ne el seu efecte regulador negatiu sobre gluconeogènesi a través de la via de FOXO1 [28, 29]. Per altra banda, potencien la via gluconeogènica perquè la metabolització d'àcids grassos proporciona substrat (AcetilCoA), energia (ATP) i poder reductor (NADH), necessaris per a la gluconeogènesi. A més, els àcids grassos poden estimular la transcripció dels gens gluconeogènics (PGC-1 α PEPCCK i glucosa-6-fosfatasa) a través de mecanismes moleculars que impliquen p38 MAPK [297].

En relació a la dislipidèmia hepàtica, els àcids grassos captats pel fetge són metabolitzats a través de, a) oxidació per a generar ATP o, b) esterificació per a generar triglicèrids. L'alteració d'una o de les dues vies condueix, en el marc de la diabetis tipus 2, a l'esteatosi hepàtica [289].

4.2 TRACTAMENT DE LA DIABETIS MELLITUS

Com que la hiperglicèmia característica de la diabetis mellitus té conseqüències greus sobre l'organisme, l'objectiu principal de tota teràpia de la diabetis mellitus és mantenir l'euglicèmia davant de les àmplies variacions de la glicèmia durant els cicles diaris d'injesta-dejuni-exercici.

A. Tractaments convencionals

A.1 DIABETIS DE TIPUS 1

En el cas de la diabetis de tipus 1, la cura ideal requeriria necessàriament la regeneració de les cèl·lules β pancreàtiques productores d'insulina, alhora que caldria contrarestar la destrucció autoimmunitària d'aquestes cèl·lules. No obstant, els tractaments que actualment estan a l'abast dels pacients no són tan perfectes:

- **teràpia substitutòria amb insulina:** consisteix en l'administració subcutània d'insulina exògena en diversos règims diaris per obtenir uns nivells d'insulina en sang que permetin mantenir un bon control de la glicèmia. Tot i que pot arribar a controlar de forma global la hiperglucèmia i retardar l'aparició de les complicacions secundàries associades, a la pràctica no resulta sempre satisfactòria degut a l'estricta règim i al control continu al qual s'han de sotmetre els pacients per assegurar l'euglicèmia. El principal problema que presenta aquesta teràpia és la manca de regulació fisiològica de l'alliberament de la insulina injectada, desembocant en freqüents hipoglicèmies i donant lloc a una morbiditat significativa. Malgrat que el diabètic tractat faci una vida normal, el seu risc de patir altres malalties no és el mateix que el de la resta de la població. Una persona afectada d'aquesta malaltia té el doble de risc de partir un infart de miocardi i no poder sobreviure, així com també té risc de fallida renal i de ceguera. Realment és una malaltia que té un impacte sobre la qualitat de vida de la persona.
- **transplantament de pàncrees o d'illots pancreàtics:** els transplantaments pretenen proporcionar una font endògena i controlada d'insulina. El transplantament de pàncrees és l'únic dels tractaments existents que és capaç de restaurar el metabolisme normal durant llargs períodes de temps. No obstant, aquests beneficis van acompanyats d'importants riscos: 1) el procediment quirúrgic encara és molt complicat tècnicament i està associat a un elevat índex de mortalitat i 2) es requereix d'un tractament d'immunosupressió crònica per tal d'evitar rebuig i/o recurrents atacs autoimmunes contra les cèl·lules β transplantades, però aquest tractament comporta un elevat risc de patir infeccions i de desenvolupar tumors. El transplantament de pàncrees és una opció terapèutica poc habitual, normalment s'aplica quan apareixen complicacions renals importants. En canvi, el transplantament d'illots pancreàtics és una alternativa més segura que el transplantament de pàncrees perquè permet l'ús de tècniques més senzilles i es poden implantar en diversos llocs de l'organisme (melsa, fetge, càpsules suprarenals, etc.) [298]. La manca de donants d'illots apropiats, el requeriment d'immunosupressió per evitar el rebuig de l'implant, així com la recidiva de la malaltia són actualment els principals problemes per a l'aplicació clínica del transplantament d'illots en el tractament de la diabetis de tipus 1.

Encara que la diabetis sigui una malaltia manejable, les complicacions que hi estan associades provoquen una elevada mortalitat i morbiditat arreu del món. Es necessiten noves aproximacions per curar-la, les quals poden venir de la mà de la **teràpia gènica**.

A.2. DIABETIS DE TIPUS 2

Actualment el control de la diabetis de tipus 2 s'exerceix mitjançant la combinació del control de la dieta amb l'ús de fàrmacs. Pel que fa a la dieta, cal disminuir el contingut de sucres senzills (monosacàrids i disacàrids) que provoquen un augment ràpid de la glicèmia, incrementar el contingut de fibra per disminuir la velocitat d'absorció dels glúcids i controlar la ingesta calòrica per millorar/evitar el sobrepès. Pel que fa als múltiples fàrmacs que existeixen per al tractament de la diabetis de tipus 2, tenen com a diana alguns dels òrgans implicats en la resistència a la insulina i la hiperglicèmia característiques de la malaltia (fetge, múscul, teixit adipós) [285]. Les principals classes de fàrmacs inclouen agents que estimulen la secreció d'insulina (sulfonilurees), que redueixen la producció hepàtica de glucosa (biguanides com la metformina), que retarden la digestió i l'absorció intestinal de glúcids (inhibidors de l' α -glucosidasa) o que milloren l'acció de la insulina als teixits perifèrics (tiazolidinediones o TZD) (Figura 23).

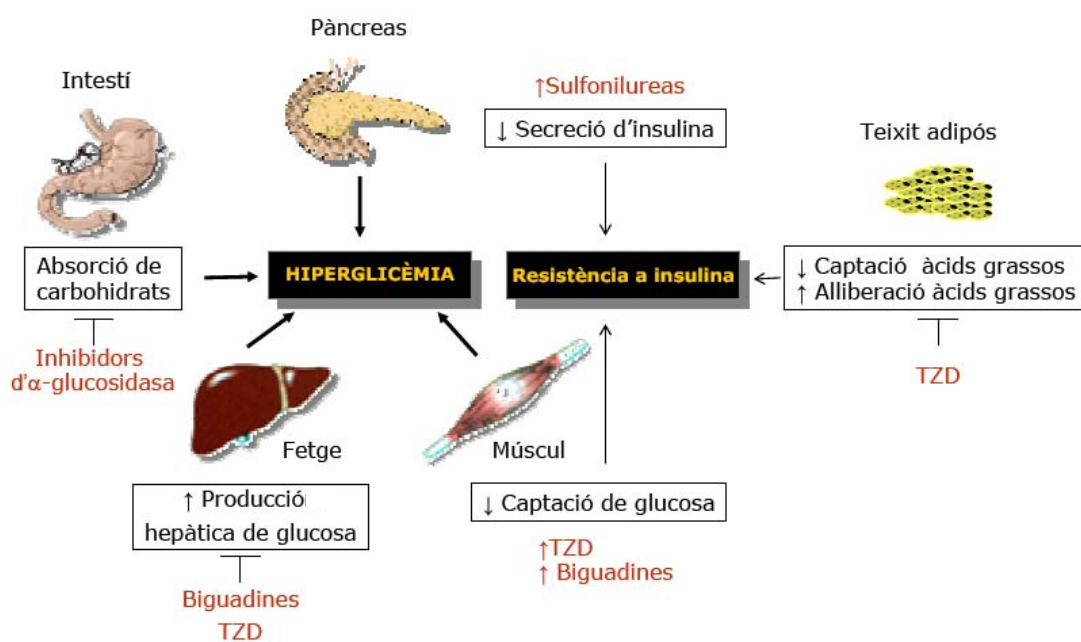


Figura 23. Representació de la contribució a la hiperglicèmia diabètica i resistència a insulina dels diferents òrgans, i de les dianes dels fàrmacs hipoglicèmics orals per a la diabetis de tipus 2.

Les **sulfonilurees** van ésser els primers fàrmacs antidiabètics del mercat. S'uneixen al receptor de sulfonilurees de les cèl·lules β i promouen secreció d'insulina. Aquest increment d'insulina en sang és suficient per a compensar la resistència dels teixits perifèrics a la insulina, de manera que s'incrementa la captació de glucosa al múscul i es redueix la producció hepàtica de glucosa. Malauradament, en la majoria dels pacients tractats amb sulfonilurees hi ha una pèrdua progressiva

de l'eficàcia del control de la glucèmia, possiblement degut al defalliment de les cèl·lules β pancreàtiques, fent necessari recórrer a la teràpia substitutòria amb insulina addicional. D'entre els efectes adversos del fàrmac es troben possibles episodis d'hipoglucèmia i increment de pes [299].

Els **inhibidors d' α -glucosidasa** actuen com a inhibidors competitiu dels enzims de la paret apical dels enteròcits, que degraden els dissacàrids a monosacàrids assimilables, reduint d'aquesta manera la taxa d'absorció de carbohidrats. La seva administració és adequada en pacients amb una diabetis incipient, o com a teràpia combinada en aquells pacients en què el tractament amb altres fàrmacs no aconsegueix un bon control de la glucèmia. Els efectes secundaris inclouen flatulències, dolor abdominal i diarrees [299].

Les **tiazolidinediones (TZD)**, entre les quals trobem la rosiglitazona i la pioglitazona, actuen com a lligands selectius del receptor nuclear PPAR- γ , expressat principalment en teixit adipós i implicat en el control de la adipogènesi [300]. PPAR- γ està implicat en el control de la transcripció de PEPCK i glicerol cinasa, incrementant la gliceroneogènesi i la reesterificació d'àcids grassos al teixit adipós i reduint-ne l'alliberament a sang. Així, l'activació de PPAR- γ al teixit adipós incrementa la capacitat de redirigir l'excés de greixos de la circulació, disminuint la concentració d'àcids grassos lliures en sang, amb la consegüent sensibilització a insulina en els teixits perifèrics i reducció de gluconeogènesi en fetge. Els efectes beneficiosos inclouen una millora en els nivells d'àcids grassos lliures i triglicèrids en sèrum, acompanyat d'un augment de la sensibilitat perifèrica a la insulina i la glucèmia. Els efectes deleteris directes inclouen un increment dels nivells de colesterol, LDL i una idiosincràtica hepatotoxicitat associada amb la primera forma comercial (troglitazona), ja retirada del mercat [299].

La **metformina** és una biguanida que constitueix actualment el fàrmac de primera elecció per als malalts de diabetis tipus 2. El seu mecanisme molecular és actualment objecte d'intens estudi. La seva diana molecular és el complex 1 de la cadena de transport d'electrons, al qual bloqueja, cosa que comporta una baixada dels nivells intracel·lulars d'ATP [301], senyal activador del major sensor metabòlic i energètic cel·lular, la cinasa dependent d'AMP (AMPK), medidora dels efectes de metformina [302, 303]. L'activació d'AMPK al fetge, principal òrgan diana de la metformina, activa vies de producció d'ATP (captació i utilització de glucosa, i β -oxidació) i inhibeix aquelles que en consumeixen (gluconeogènesi, lipogènesi). La metformina, en menor mesura, també activa la captació i utilització de glucosa en múscul [304, 305]. Després d'una administració oral de metformina, la droga exerceix el seu efecte principalment al fetge, deixant el múscul esquelètic en segon pla degut a les baixes concentracions de la droga a la circulació perifèrica, ja que la vena porta rega directament el fetge des de l'intestí. Entre els efectes adversos, el més freqüent és la diarrea,

que afecta en un 30% de forma dosi-depenent, i en menor freqüència es donen casos d'acidosi làctica [299].

Aquests tractaments farmacològics per a la diabetis de tipus 2 no resulten totalment satisfactoris. L'eficàcia de la monoteràpia minva amb el temps, fent necessari recórrer a la teràpia combinada (sulfonilurea+metformina; inhibidor de α -glucosidasa+metformina; glitazona+metformina, etc.) amb la finalitat d'aprofitar un efecte sinèrgic dels mecanismes d'acció dels fàrmacs. Així i tot, no s'aconsegueix un control total de la glucèmia ni de la homeòstasi de lípids, per tant, no s'eviten els episodis d'hipoglucèmia, ni l'aparició de les complicacions secundàries a llarg termini associades a la malaltia.

B. Teràpia gènica de la diabetis

En les últimes dues dècades hem estat testimonis del naixement i dels primers passos de la teràpia gènica. Entenem com a teràpia gènica a aquelles intervencions en les que es prevé o es cura una malaltia mitjançant la transferència d'àcids nucleics per a la modificació directa de gens o dels seus productes (mRNA). L'ús del material genètic com a eina terapèutica obre una finestra d'esperança en aquelles malalties per a les quals, fins el moment, hi ha poques expectatives de cura amb la farmacologia tradicional. La teràpia gènica aporta, per primera vegada, la possibilitat de tractar no només els símptomes, sinó també de curar la malaltia definitivament actuant de forma específica sobre el gen causant de la patologia en el teixit afectat.

Tot i que l'aplicació més òbvia, i en la que les primeres aproximacions de teràpia gènica es centraren, és en el context de malalties monogèniques d'origen congènit (fibrosi quística, distròfia muscular de Duchenne, hemofílies, immunodeficiències combinades severes com la SCID o la X-SCID, hipercolesterolèmia familiar, etc.) la teràpia gènica és aplicable a totes aquelles malalties amb un component genètic, com ara algunes patologies poligèniques (càncer, Alzheimer, Parkinson, diabetis, etc.) o fins i tot malalties infeccioses (SIDA, hepatitis B, etc.). A més a més, en el cas que es disposi de diagnòstic prematur, la teràpia gènica podria permetre una actuació de profilaxi *in utero*.

Les intervencions de la teràpia gènica poden ser a diferents nivells:

- **Addició gènica:** transferència d'un gen o cDNA, el dèficit del qual és la causa de la patologia. Aquesta aproximació és la més comú en malalties congènites monogèniques.
- **Silenciament gènic:** transferència d'una seqüència d'àcid nucleic (oligonucleòtids antisentit, RNA d'interferència, ribozims, etc.) que permeten, mitjançant l'acoblament homòleg amb un mRNA/DNA diana, la reducció de l'expressió gènica d'un gen involucrat en l'etiologia o el desenvolupament de la malaltia.

Existeixen dues categories de teràpia gènica en funció de l'estratègia que se segueixi en l'alliberament del material genètic a les cèl·lules diana del pacient:

- **In vivo:** on les cèl·lules són modificades genèticament *in situ*. El material genètic s'injecta, amb o sense vector, de forma local o sistèmica. Per tant, els requisits essencials per al disseny d'un fàrmac de teràpia gènica *in vivo* són la seva estabilitat en fluids fisiològics, la relació dosi-resposta, la biodisponibilitat a la cèl·lula diana i la possibilitat de readministració sense efectes tòxics o immunològics.
- **Ex vivo:** on les cèl·lules del teixit que es vol modificar genèticament són obtingudes mitjançant una biòpsia i cultivades *in vitro*. Un cop en cultiu, aquestes cèl·lules es modifiquen genèticament mitjançant l'ús del vector adequat i posteriorment es reimplanten de nou en l'individu. Introduir gens en aquestes cèl·lules és una fita bastant més fàcil, minimitza la toxicitat del vector, permet la verificació i control post-transfecció abans de la reintroducció al pacient i maximitza l'eficiència de transducció.

El principal problema de la teràpia gènica resideix, fonamentalment, en el desenvolupament d'un sistema de transferència que permeti alliberar el material genètic a l'interior cel·lular de manera segura, eficient i específica. En el disseny de l'estratègia de transferència gènica per a un protocol de teràpia gènica cal tenir en compte quatre factors crítics:

1. Eficiència de transferència del material genètic (*delivery*).
2. Especificitat sobre el teixit o cèl·lula diana.
3. Persistència i regulació de l'expressió gènica.
4. Toxicitat.

El sistema de transferència gènica d'elecció (vector, via d'administració, etc.) per a satisfer tots els requisits dependrà de les característiques intrínseques de la malaltia a tractar i del teixit diana. L'èxit d'una estratègia de teràpia gènica depèn, en gran part, de la capacitat de conduir el material genètic de forma eficient, específica i segura a les cèl·lules diana. Els vectors de teràpia gènica han de superar una sèrie d'obstacles abans que el gen d'interès tingui l'efecte desitjat. Inicialment, el vector ha d'arribar a la superfície de la cèl·lula desitjada. Després de contactar amb la cèl·lula, els vectors han d'unir-se i entrar al seu interior. Un cop dins la cèl·lula, el material genètic ha d'ésser alliberat i evitar la seva degradació pels lisosomes. Finalment, el material genètic ha de translocar-se al nucli prèviament a què es pugui produir l'expressió dels gens.

El ventall de sistemes de transferència gènica que s'han desenvolupat fins el moment es poden classificar en dos grups: mètodes de transferència gènica vírics i mètodes no vírics. Cada sistema té els seus peculiars avantatges i inconvenients que el fan apropiat per a una determinada finestra d'aplicacions.

1. Mètodes vírics

Els virus s'han especialitzat durant milions d'anys d'evolució en la transducció del seu material genètic al nucli de cèl·lules eucariotes, convertint-se en potents eines per a la transferència gènica al nucli de la cèl·lula diana. S'han desenvolupat vectors virals: la càpside vírica d'aquests vectors conté un genoma víric que ha estat manipulat genèticament de manera que només tenen la capacitat d'infectar la cèl·lula i introduir el material genètic però sense poder replicar-se per produir nous virus recombinants [306]. A la taula 8, es recullen els diversos tipus de virus existents a la natura que s'han modificat per tal de poder-los utilitzar com a vectors de teràpia gènica.

Vectors	Avantatges	Desavantatges
Adenovirus	<ul style="list-style-type: none"> - Infecten cèl·lules proliferants i quiescents. - Facilitat de producció a gran escala. - Alts nivells d'expressió. - Gran capacitat de DNA : (1a<2ageneració<gutless). 	<ul style="list-style-type: none"> - Expressió transitòria: (1a<2ageneració<gutless). - Immunogenicitat: (1a>2ageneració>gutless). - Tropisme promiscu, infecció no controlada.
Virus adenoassociats (AAV)	<ul style="list-style-type: none"> - Infecten cèl·lules proliferants i quiescents. - Estabilitat elevada. - No patogènic i poc immunogènic. - Tropisme ampli. 	<ul style="list-style-type: none"> - Limitació de la mida de l'insert (4.5 Kb) - Efectivitat limitada a la presència d'anticossos preexistents contra AAV. - Possibilitat d'integració a l'atzar. - Difícil de produir.
Retrovirus (MMLV)	<ul style="list-style-type: none"> - Expressió estable. - No hi ha expressió de proteïnes víriques. 	<ul style="list-style-type: none"> - Només infecta cèl·lules proliferants. - Integració aleatòria en el genoma de l'hoste: possibilitat de mutagènesi per inserció. - Límit de l'insert (8 Kb).
Lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> - Infecten cèl·lules proliferants i quiescents. - Expressió de llarga durada. 	<ul style="list-style-type: none"> - Possible toxicitat de les proteïnes víriques d'empaquetament. - S'integra dins del genoma hoste.
Herpes virus	<ul style="list-style-type: none"> - Infecten cèl·lules proliferants i quiescents. - Gran capacitat de DNA (50 Kb). 	<ul style="list-style-type: none"> - Neurotoxicitat mal caracteritzada. - Expressió transitòria.

Taula 8. Vectors virals per a la teràpia gènica: avantatges i desavantatges

Malauradament, els mètodes vírics han mostrat greus problemàtiques entre les que es compten la limitació en la mida de l'insert, immunogenicitat, potencial mutagènesi insercional i insuficient especificitat infectiva.

2. Mètodes no vírics

Els vectors no virals presenten com a principal avantatge la seva seguretat, ja que no tenen potencial patogènic ni genotòxic. No obstant, tenen l'inconvenient de no ésser tan eficients com els vectors virals a l'hora de transferir gens. Tanmateix, la seva fàcil manipulació, el baix cost que suposa la seva producció i l'alta flexibilitat en la mida del transgen que és alliberat, han fet dels vectors no virals un dels sistemes de transferència gènica més atractius per a la seva utilització en teràpia gènica (Taula 9).

Vectors		Avantatges	Desavantatges
DNA nuu		<ul style="list-style-type: none"> - Producció fàcil, segura i econòmica. - Administració senzilla. 	<ul style="list-style-type: none"> - Susceptibilitat a nucleases plasmàtiques. - Resposta immune humoral i citotòxica en resposta al DNA bacterià. - Ràpid <i>clearance</i> per monòcits i cèl·lules endotelials hepàtiques. - Baixa transducció.
Mètodes físics	Gene gun	- Aplicabilitat en vacunes de DNA.	- Baixa penetrabilitat del DNA al teixit.
	Electroporació	- Millora la transducció del DNA plasmídic.	- Aplicabilitat superficial (pell, múscul, etc.).
	Transferència hidrodinàmica	<ul style="list-style-type: none"> - Facilitat d'injecció. - No encapsulament del DNA necessari. - Bona eficiència de transducció. 	<ul style="list-style-type: none"> - Lesió hepàtica transitòria. - Dificil aplicació en mamífers superiors i en clínica. - Expressió transitòria.
Mètodes biològics	Lipoplex	<ul style="list-style-type: none"> - Protecció del DNA davant de nucleases. - Facilitat de producció del vector. - Bones eficiències <i>in vitro</i>. 	<p>Greus limitacions <i>in vivo</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Heterogeneïtat de les formulacions i inestabilitat dels complexos. - Baixa eficiència de transfecció. - Especificitat pobre. - Toxicitat cel·lular associada al lípid. - Trànsit ineficient del DNA cap al nucli.
	Poliplex: polietilenimina, oligopèptids i poli-L-lisina.	<ul style="list-style-type: none"> - Protecció del DNA davant de nucleases. - Facilitat de producció del vector. - Permeten ancorar un lligand per a obtenir transferència gènica mitjançada per receptor. - Excel·lents transfeccions <i>in vitro</i>. 	<p>Greus limitacions <i>in vivo</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Agregament en fluids fisiològics. - Toxicitat <i>in vivo</i> associada al PEI. - Trànsit ineficient del DNA cap al nucli.

Taula 9. Mètodes de transferència gènica no virals: avantatges i inconvenients.

L'aspecte comú a optimitzar tant en sistemes virals com no virals és el *delivery* selectiu i eficient cap al teixit o cèl·lula diana. Un altre aspecte important per a la teràpia gènica, tant viral com no viral, és conèixer els mecanismes moleculars causants de les patologies per poder trobar bones dianes terapèutiques.

B.1 TERÀPIA GÈNICA PER A LA DIABETIS DE TIPUS 1

La destrucció autoimmunitària del pàncrees limita en gran manera les possibles aproximacions de teràpia gènica per a la diabetis tipus 1. Fins el moment s'han investigat les aproximacions següents, algunes de les quals estan en fase d'assaig clínic:

1. Modificació del sistema immune per evitar el rebuig de la cèl·lula β : en la fase pre-simptomàtica de la malaltia, en la qual les cèl·lules β encara són presents tot i que s'ha iniciat la seva destrucció, existeixen diversos anticossos al sèrum dels pacients i també cèl·lules limfocitàries al voltant de les cèl·lules β que són marcadors de la malaltia. Si es realitzessin estudis diagnòstics per determinar la presència d'aquests marcadors en la població de risc, es podria aplicar algun mecanisme preventiu per aturar la destrucció de les cèl·lules β abans que tingui lloc. Malgrat que la teràpia gènica té actualment poques possibilitats per modificar la reacció anòmala del sistema immune, algunes de les vies que s'han testat [307] s'anomenen a continuació:

- a) inhibició de les molècules implicades en el desenvolupament de la diabetis de tipus 1 (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, NO).
- b) inhibició de la interacció entre Fas i Fas-L, que semblen estar directament implicades en la inducció de la mort cel·lular.
- c) activació de l'expressió de IL-4, GAD65 o IA-2, les quals poden prevenir la destrucció de la cèl·lula β i reduir el procés inflamatori.
- d) producció local, en cèl·lules β modificades genèticament, de molècules anti-CD40-ligand, la qual juga un paper clau en l'activació de limfòcits T directament implicats en el procés de rebuig autoimmunitària.

Aquest tipus de teràpia serà eficaç quan es pugui realitzar un diagnòstic precoç del procés immunològic tot i que cal més recerca sobre quins són els processos implicats en la destrucció de les cèl·lules β .

2. Promoció de la formació o regeneració de les cèl·lules β productores d'insulina: es tracta d'una estratègia de regeneració o substitució de les cèl·lules β perdudes, ja que tenen una maquinària complexa dedicada a mantenir el control estricte de la secreció d'insulina en funció de la glicèmia que fins el moment no s'ha pogut reproduir en cap altre tipus cel·lular. Essencialment, aquesta

maquinària té dues funcions que es mantenen estretament acoblades: la sensibilitat a la glucosa i la producció d'insulina. Per exemple, s'ha intentat la regeneració de les cèl·lules β a partir de cèl·lules mare pancreàtiques o extrapancreàtiques (de la medul·la òssia o del fetge), les quals poden ésser cultivades *ex vivo*, manipulades genèticament i reintroduïdes al pàncrees del pacient [308].

3. **Producció ectòpica d'insulina** sota el control de promotors sensibles a glucosa, que implica la manipulació genètica d'òrgans (com fetge, múscul, intestí) per a què secretin insulina de forma més o menys fisiològica [309-311]. Aquesta estratègia té l'avantatge d'esquivar l'atac immune del que són objectes les cèl·lules β ; però calen uns requisits difícils d'assolir com un sistema de control de l'expressió, emmagatzemament i secreció d'insulina sensible a la concentració de glucosa en sang. Una altra opció és la transdiferenciació de cèl·lules del fetge en cèl·lules β mitjançant l'expressió hepàtica del gen Pdx-1 (implicat en la formació i desenvolupament del pàncrees i en el control de l'expressió del gen de la insulina en les cèl·lules β madures) per induir la secreció hepàtica d'insulina [312].

4. **Induir els teixits perifèrics a la captació i utilització de glucosa i/o inhibir la producció hepàtica de glucosa.** Vistes les dificultats d'obtenir una secreció regulada d'insulina en el context d'un pacient diabètic, s'han buscat estratègies independents a la hormona per a reduir la hiperglicèmia diabètica (la qual recordem que és el resultat d'una disminució en la captació del sucre pel fetge i teixits perifèrics, sobretot múscul esquelètic, així com d'un increment en la producció hepàtica de glucosa). Aquestes tàctiques també són aplicables per a la diabetis de tipus 2 i seran comentades en l'apartat de diabetis de tipus 2.

5. **Evitar les complicacions de la diabetis:** malaltia macrovascular, neuropatia i malaltia microvascular. Com que el control de la glicèmia encara és un problema no resolt del tot satisfactòriament, molts pacients diabètics acaben presentant efectes vasculars de la diabetis que han d'ésser tractats. Existeixen diverses aproximacions experimentals de teràpia gènica per als problemes vasculars de la diabetis, algunes de les quals estan en fase d'assaig clínic. Un exemple és el tractament de la cistopatia diabètica amb l'ús del virus de l'herpes simple per dirigir i expressar el gen del "*nerve growth factor*" en la bufeta de l'orina [313].

Tot i que els estudis de teràpia gènica de la diabetis van evolucionant, fins el moment, però, no existeix cap opció que reemplaci a la teràpia substitutòria d'insulina injectada en la clínica de la diabetis de tipus 1.

B.2 TERÀPIA GÈNICA PER A LA DIABETIS DE TIPUS 2

La diabetis de tipus 2 és una malaltia multigènica i multifactorial la característica principal de la qual és la resistència a insulina en els teixits perifèrics. El fet que sigui una malaltia complexa, amb abundants processos fisiopatològics en diversos teixits, és un repte important per a la terapèutica.

La teràpia gènica per a la diabetis de tipus 2 no només presenta els problemes inherents a en quant a la dificultat de transferir gens eficientment pels mètodes que actualment tenim a l'abast, sinó que a més és difícil trobar bones dianes terapèutiques perquè es tracta d'una malaltia amb una etiologia poc definida. Es pot dir, doncs, que la teràpia gènica de la diabetis de tipus 2 va a cavall dels descobriments de les vies moleculars que modulen les disfuncions de la malaltia als diferents òrgans [314, 315].

Les estratègies més plausibles per a la teràpia gènica de la diabetis de tipus 2 són aquelles que pretenen **induir la captació i utilització de glucosa als teixits perifèrics i/o inhibir la producció hepàtica de glucosa**, per tal de disminuir la hiperglicèmia diabètica. Per a tal fita s'ha emprat la tecnologia del RNA d'interferència, oligonucleòtids antisentit o sobreexpressió de proteïnes i factors de transcripció amb la finalitat de modular la via de senyalització d'insulina i/o de la regulació de la gluconeogènesi hepàtica, vehiculitzats tant per vectors virals com no virals. Aquests estudis han resultat essencials per a dilucidar els mecanismes de control de la homeòstasi energètica i validar-ne possibles dianes terapèutiques.

Sobreexpressió de proteïnes

En els últims anys s'han assajat diverses estratègies que empren vectors d'expressió de proteïnes les quals incrementen la sensibilitat a la insulina i la captació de glucosa en diversos teixits com el fetge, el múscul esquelètic o el teixit adipós.

- **Múscul:** representa aproximadament el 40 % de la massa corporal i és un òrgan essencial per a la captació i oxidació de glucosa i àcids grassos. En diabetis la captació de glucosa al múscul està compromesa com a conseqüència de la resistència a insulina, de manera que contribueix en gran mesura a la hiperglicèmia. La seva accessibilitat permet l'ús de tècniques de transferència gènica no virals, com l'electroporació, o virals, com injeccions intramusculars de virus adenoassociats (AAV1). Per exemple, s'ha provat l'estratègia de sobreexpressar la GK al múscul per incrementar la captació de glucosa mitjançant electroporació [316] o amb vectors virals [317], tot i que l'efectivitat de reversió de la simptomatologia diabètica i de l'obesitat variava segons el model animal diabètic emprat [318-320]

D'altra banda, s'ha desenvolupat un ratolí transgènic que expressa insulina a nivells basals al múscul per incrementar la captació de glucosa, tot i que no és capaç de corregir la hiperglicèmia quan

s'indueix diabetis amb estreptozotocina [316]. Anant un pas més enllà, s'han expressat conjuntament nivells basals d'insulina i de GK al múscul esquelètic [321], en un intent de generar un sistema "sensor de glucosa", i s'obtingué un manteniment de la normoglicèmia tant en alimentació com en dejuni. En aquest model, possiblement la GK produïda actuava a nivell de múscul i la insulina a nivell sistèmic de manera que s'incrementava la captació de glucosa al múscul i es disminuïa la producció hepàtica de glucosa.

- **fetge:** s'hi ha estudiat la potenciació de l'activitat enzimàtica de la GK amb la intenció d'incrementar la captació de glucosa (es comentarà detalladament al següent apartat). Per altra banda, existeixen aproximacions com l'expressió d'un mutant de la PFK-2 hepàtica, que activa la producció de fructosa-2,6-bisfosfat en el fetge de models animals de diabetis tipus 2 i resulta en la reducció de la producció hepàtica de glucosa i en l'augment de la captació de glucosa al fetge. En aquest model fou interessant observar que la disminució de la resistència a insulina al fetge tenia com a conseqüència una reducció dels nivells de triglicèrids en sang i una reducció de l'adipositat [32].

- **intestí:** el GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*) és un pèptid secretat per les cèl·lules L de l'intestí en resposta a la ingesta i té una acció insulinoatròpica dependent de glucosa, de manera que redueix els nivells de glucosa i de la secreció postprandial de glucagó, a més que millora la funció de les cèl·lules β del pàncrees i del buidat gàstric. La seva vida mitjana curta fa que una teràpia basada en la injecció del pèptid sigui inviable. S'ha intentat l'expressió ectòpica de GLP-1 mitjançada per vectors adenovirals i resultà en una millora de l'homeòstasi de glucosa i la normalització de la insulinèmia en models animals de diabetis severa [322, 323].

Silenciament de gens

Aproximacions basades en oligonucleòtids antisentit (ASO): Els antisentit són oligonucleòtids de RNA, DNA o anàlegs d'àcids nucleics (ANA) sintetitzats químicament, que presenten homologia pel mRNA que codifica per la proteïna diana, al qual s'aparellen i en bloquegen la traducció i/o estimulen la seva degradació. Aquesta tecnologia ja s'està emprant en la clínica (Vitravene®) i en múltiples estudis clínics, per a bloquejar la producció de proteïnes determinants en el desenvolupament de determinades patologies.

La biodistribució, així com els teixits en què s'expressa el mRNA diana, són factors a tenir en compte en l'elecció dels ASO com a eina terapèutica. Per exemple, després d'una injecció intraperitoneal d'ASO, aquests s'acumulen al fetge i al teixit adipós, però no en el múscul. Així, les aproximacions terapèutiques per a diabetis basades en ASO s'han centrat en el fetge com a òrgan diana.

En els últims anys la companyia farmacèutica ISIS Pharmaceuticals Inc. ha realitzat un exhaustiu cribatge per identificar dianes susceptibles d'una intervenció farmacològica per a la diabetis utilitzant

ASO. Alguns d'aquests ASO, en concret els dirigits contra FOXO1 i PTP1B, han aportat resultats positius en estudis pre-clínic i clínic:

- FOXO1: la implicació d'aquest factor de transcripció en la diabetis ha estat àmpliament demostrada [324-327]. Aquests resultats apunten a què la reducció de FOXO1 en estats diabètics podria restituir l'acció de la insulina al fetge. En aquesta línia, Samuel *et al* han demostrat que un silenciament modest de FOXO1 al fetge de ratolins obesos, mitjançant oligonucleòtids antisentit (ISIS188764), va produir una reducció del mRNA de glucosa-6-fosfatasa i PEPCK-C (enzims típicament gluconeogènics) i una baixada en la producció endògena de glucosa, que conduí a una millora de la glicèmia, tolerància a glucosa, insulinèmia i sensibilitat a insulina no només al fetge, sinó també al teixit adipós.
- PTP1B: és una proteïna fosfatasa que interacciona i desfosforila el receptor de la insulina, IRS-1 i IRS-2, regulant negativament la cascada de senyalització d'insulina, els nivells de la qual estan incrementats en pacients obesos amb resistència a insulina [328-330]. El silenciament de PTP1B en fetge a través d'oligonucleòtids antisentit (ISIS 113715) està en fase 2 d'investigació clínic per avaluar la seva capacitat de millorar o restablir la sensibilitat a insulina en pacients de diabetis de tipus 2 [331, 332].
- ACC: aquest enzim catalitza la síntesi de malonil CoA implicada en la lipogènesi. Múltiples evidències suggereixen que l'acumulació de lípids al fetge en estats prediabètics està directament lligada al desenvolupament de resistència a insulina i a una producció hepàtica de glucosa incrementada, ambdós elements clau en la patogènesi de la diabetis de tipus 2. La reducció de la lipidosi hepàtica podria ésser, per tant, una altra estratègia terapèutica i una possible diana pot ésser l'ACC. Donat que n'existeixen dues isoformes, ACC1 i ACC2, s'ha utilitzat un ASO contra les dues formes de l'enzim que en models animals de diabetis induïda per dieta ha comportat una menor lipidosi i una menor producció hepàtica de glucosa, conjuntament amb una millora de la sensibilitat hepàtica a la insulina [333].

Aproximacions basades en RNA d'interferència: El 1998, Andrew Fire i Craig Mello van descriure per primera vegada el fenomen de RNA d'interferència (RNAi), en observar en els seus estudis en *C. elegans* que el dsRNA tenia major eficiència per inhibir l'expressió gènica que les seqüències sentit i antisentit per separat i que, a més, aquest efecte de silenciament era sistèmic i heretable [334]. Aquest descobriment va desencadenar un estudi intens per dissecionar el mecanisme molecular del RNAi [335].

El RNAi ha revolucionat la recerca biomèdica, ja que permet identificar la funció dels gens i validar-los com a potencials dianes terapèutiques. No és estrany, doncs, que múltiples companyies farmacèutiques estiguin invertint esforços en desenvolupar teràpies basades en RNAi. En les

aplicacions terapèutiques basades en RNAi, la barrera més important ha estat el *delivery* i l'estabilitat de la molècula en l'organisme [336, 337]. S'han realitzat diversos estudis de validació de dianes farmacològiques per als RNAi en el fetge perquè és un dels òrgans més accessibles, ja sigui mitjançant tècniques no virals, com la injecció endovenosa de siRNA o de vectors shRNA [338-342], o virals amb vectors shRNA en adenovirus aprofitant el tropisme natural dels adenovirus pel fetge. Alguns exemples d'aquests estudis es citen a continuació:

- PGC-1 (*peroxisome proliferator-activated coactivator-1*): és un factor de transcripció implicat en la regulació de gens gluconeogènics i d'oxidació d'àcids grassos, l'expressió del qual està incrementada en diabetis. El seu silenciament en ratolins db/db va resultar en una normalització de la glicèmia i una millor tolerància a la glucosa i sensibilitat hepàtica a la insulina [343, 344].
- PEPCK-C: és l'enzim que catalitza la reacció limitant en la gluconeogènesi hepàtica. El silenciament parcial i transitori del gen que codifica per la PEPCK-C, mitjançant la injecció d'un vector plasmídic per expressar un shRNA contra la PEPCK-C al fetge, va resultar en una millora de la glicèmia en dejuni i en la tolerància a la glucosa en models de ratolins amb diabetis de tipus 1 [345]. En emprar un adenovirus per dirigir el shRNA de PEPCK-C al fetge de ratolins db/db, es van obtenir uns efectes similars als obtinguts amb un tractament farmacològic amb metformina [346].

La teràpia gènica ha arribat al seu període de maduresa, després de diverses dècades d'ésser la candidata a revolucionar la medicina moderna. Tot i que s'estan realitzant multitud d'assajos clínics a tot el món, no s'ha assolit l'èxit esperat en part per problemes en els vectors vírics i no vírics emprats. Per altra banda, el *delivery* continua estant la limitació més important per a l'èxit en els tractaments en humans. Cal més recerca. Per la seva banda, la diabetis és una patologia dinàmica, des del punt de vista científic. La seva complexitat i els abundants mecanismes fisiopatològics que la defineixen suposen un repte important per a la terapèutica. Cal també més recerca en aquest camp.

4.3 AUGMENT DE L'ACTIVITAT GK COM A TERÀPIA DE LA DIABETIS MELLITUS

Per al tractament de la diabetis, es busquen dianes que tinguin una gran força de control en la regulació de l'homeòstasi de glucosa. Seguint aquests criteris, la GK és una diana terapèutica prometedora: per una banda, la GK és un sensor de glucosa a les cèl·lules β pancreàtiques on determina la secreció d'insulina i, per l'altra, juga un paper principal en la captació de glucosa per part del fetge. Actualment és del tot acceptat que la GK té una elevada força de control en el sistema complex d'homeòstasi de glucosa, tal i com demostra l'efecte que tenen algunes mutacions activadores i inhibidores d'aquest enzim sobre l'homeòstasi de glucosa en humans conduint a malalties com PHHI (*persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy*) o diabetis mellitus, respectivament.

En el cas de la diabetis de tipus 1, a causa de destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques i una conseqüent manca d'insulina, no hi ha expressió de GK al fetge. En el context d'aquesta malaltia, s'ha plantejat induir l'expressió de GK al fetge mitjançant diverses aproximacions de teràpia gènica amb la finalitat de fomentar la captació i utilització hepàtica de glucosa, i, així, reduir la hiperglicèmia diabètica. A nivell farmacològic, el descobriment d'activadors sintètics de la GK (GKAs) també ha plantejat una teràpia complementària per als pacients amb diabetis de tipus 1. Com que els GKAs només són efectius quan hi ha expressió de GK, no es podrien aplicar com a teràpia exclusiva en els pacients de diabetis de tipus 1, els quals no expressen la GK ni al pàncrees (a causa de la destrucció de les cèl·lules β), ni al fetge (a causa de la manca d'insulina). No obstant, podrien usar-se complementàriament al tractament amb insulina per potenciar l'efecte de la insulina al fetge dels pacients, i potser també podrien afectar directament les altres cèl·lules on s'expressa la GK (hipotàlem, intestí, pituïtària) per millorar la regulació de la glicèmia.

En els pacients amb diabetis de tipus 2, hi ha un coneixement poc exacte sobre l'estat de la GK en els diferents teixits durant els diversos estadis de la malaltia. S'ha detectat un increment de l'activitat GK al fetge en casos d'hiperglicèmia en dejuni, o d'alteració en la tolerància a la glucosa o en formes suaus de diabetis de tipus 2 [347]; mentre que l'activitat GK estava disminuïda en pacients diabètics amb obesitat mòrbida [348]. Aquests resultats van en línia amb els obtinguts en models animals de diabetis associada a obesitat [349]. Aquests fets suggereixen que, en la diabetis de tipus 2, la deficiència de GK al fetge té lloc només en casos d'obesitat i en les fases tardanes o formes més severes de la malaltia. Inicialment, els individus obesos tenen nivells normals de glicèmia en dejuni amb un increment de la insulinèmia, però esdevenen progressivament més hiperglicèmics i resistents a la insulina amb una disminució dels nivells d'insulinèmia associats amb una disfunció de la cèl·lula β .

Encara hi ha menys informació en referència a l'activitat GK a la cèl·lula β en casos de diabetis de tipus 2 [350-352]. Tenint en compte la fisiologia de l'enzim, es podria especular que l'activitat GK a la cèl·lula β és normal en casos d'alteracions de la glicèmia en dejuni o intolerància a la glucosa, i que està disminuïda en les fases tardanes i/o severes de la malaltia. Per exemple, estudis en illots pancreàtics aïllats de pacients amb diabetis de tipus 2 demostraven que l'alliberament d'insulina estimulat per glucosa era clar, tot i que reduït, suggerint la presència d'un sensor de glucosa funcional [351]. A més a més, l'èxit d'inhibidors que requereixen activitat GK intacta per a ésser efectius en cèl·lula β reforcen el concepte que la funció GK en aquestes cèl·lules diabètiques era normal. Ara bé, potser en el context de la diabetis de tipus 2 la GK pateix una sèrie d'alteracions en les interaccions proteïques que regulen la seva activitat, o en les associacions amb orgànuls cel·lulars, etc., de manera que podria canviar la seva funcionalitat enzimàtica. Per exemple, s'ha demostrat que en models animals de resistència a insulina hi ha una desregulació de la translocació nuclear de la GK hepàtica en què està implicada la GKR [203, 353].

Encara que hi ha dubtes sobre els nivells de GK en les diferents fases de la diabetis de tipus 2, s'ha testat la possibilitat d'incrementar l'activitat GK mitjançant activadors sintètics de la GK (GKAs) i també mitjançant la sobreexpressió hepàtica de l'enzim com a possible teràpia.

A. Sobreexpressió de la GK al fetge diabètic

A.1 Sobreexpressió hepàtica de GK en casos de diabetis de tipus 1

Dos grups independents han estudiat la sobreexpressió de GK en el fetge d'animals amb diabetis de tipus 1 induïda amb estreptozotocina (STZ, tòxic selectiu de la cèl·lula β pancreàtica) [116, 354, 355] i han obtingut un fenotip semblant (Taula 10). Els animals tractats amb STZ tenen una deficiència total d'insulina, de manera que presenten hiperglicèmia a causa de la manca de captació i metabolisme de glucosa. A més, la deficiència d'insulina activa la lipòlisi perifèrica, accelera l'oxidació d'àcids grassos al fetge i resulta en un increment dels nivells de TAG a causa de la reesterificació de l'excés d'àcids grassos. L'expressió hepàtica de GK en aquest context condueix a una disminució de la hiperglicèmia, possiblement augmentant la dependència del múscul i altres teixits perifèrics en els àcids grassos per a obtenir energia i, en conseqüència, disminuint els nivells circulants d'àcids grassos lliures. Aquesta reducció al seu torn redueix la quantitat d'àcids grassos disponibles per a la síntesi de TAG i l'oxidació d'àcids grassos al fetge. En ambdós casos s'obté una disminució de l'oxidació hepàtica d'àcids grassos, tal com indica la reducció del mRNA de Cpt1. Si aquests models són correctes suggereixen que la sobreexpressió hepàtica de GK condueix a la normoglicèmia gràcies a l'increment de l'oxidació d'àcids grassos als teixits perifèrics.

Durant la diabetis, a causa de la manca d'insulina i l'increment del glucagó, la glicogen sintasa està fosforilada i inactiva de manera que no s'acumula glicogen al fetge. L'estimulació de l'activitat GK en el fetge amb diabetis tipus 1 promou la síntesi de glicogen (de manera dosi-dependent), així com activa les vies glicolítiques i disminueix les vies de producció de glucosa, resultant en l'esmentada normalització de la hiperglicèmia diabètica.

Estudi	Ferre <i>et al</i>	Morral <i>et al</i>	
Referències	[116]	[355]	[354]
Model animal:			
- Espècie	<i>M.musculus</i>	<i>Rattus norvegicus.</i>	<i>Rattus norvegicus.</i>
- Pes/Edat inicial	4-8 setmanes	100-130 g	100-130 g
- Transf. gènica	transgènic	Adenovirus	Adenovirus
- Espècie transgen	GK de rata	GK de rata	GK de rata
- Promotor	PEPCK-C	EF1 α	EF1 α
- Inducció diabetis	Streptozotocina (STZ)	STZ	STZ
- Temps anàlisi	7 dies post-STZ	17 dies	17 dies
- Nivells transgen	x2 (activitat)	x2.3 / x11.6 (activitat)	x 11.6
Metabòlits sang:			
- glucosa	↓	=	↓
- triglicèrids	↓		↓
- àcids grassos	↓		=
- β -hidroxibutirat	↓		↓
Metabòlits fetge:			
- glucosa-6-fosfat	↑	-	-
- glicogen	↑	=	↑
- lactat	↑	=	↑
- triglicèrids	-	=	↑
Enzims i factors de transcripció hepàtics (mRNA):	↑ PK ↓ PEPCK-C, Cpt1, Cpt2, HMGCoA sintasa, TAT, GLUT-2 = GLUT-1		↑ L-PK, FAS, ChREBP, SREBP-1c, PPAR- γ , FABP5, SCD-1 ↓ fumarat hidratasa, DGAT1 = HMGCoA reductasa, DGAT2, MTP, FOXO1a

Taula 10. Estudis de sobreexpressió hepàtica de GK en models animals de diabetis de tipus 1 i analitzats en estat d'alimentació. "(activitat)", els nivells de transgen s'han determinat per nivells d'activitat GK en comparació amb els grups control; "↓", disminució significativa; "↑", augment significatiu; "=" sense variació respecte els controls; "-" no determinat. En negreta es mostren els criteris de divisió de la columna corresponent.

Ambdós grups difereixen en l'efecte de la sobreexpressió hepàtica de GK sobre el β -hidroxibutirat i els àcids grassos en sang. Segons Morral *et al* la reducció del β -hidroxibutirat reflecteix la reducció de l'oxidació d'àcids grassos al fetge i, en conseqüència, no canvien els nivells d'àcids grassos sanguinis, si bé augmenten els triglicèrids hepàtics.

A l'hora de comparar els dos estudis cal tenir en compte que, a part d'ésser en espècies animals diferents, s'han usat estratègies diferents de transferència gènica. En el cas dels transgènics, el fet d'expressar el transgen al llarg de la vida de l'animal pot causar l'aparició de mecanismes adaptatius. En el cas del tractament amb adenovirus, cal observar que el propi tractament amb adenovirus pot condicionar metabòlicament els animals [354, 355]: el grup control amb adenovirus presenta un increment del glicogen i dels triglicèrids hepàtics en comparació amb els animals no tractats, a més d'una reducció dels nivells sanguinis de β -hidroxibutirat, triglicèrids i àcids grassos lliures.

En conjunt, la sobreexpressió de GK al fetge pot ésser una bona estratègia per a reduir la hiperglicèmia i la dislipidèmia típiques de la diabetis de tipus 1. No obstant, l'estudi de Morral *et al* suggereix el risc de la inducció de la lipogènesi hepàtica com a efecte no desitjable [354, 355].

A.2 Sobreexpressió hepàtica de GK en casos de diabetis de tipus 2

Tot i que s'han usat múltiples models animals per analitzar els efectes de la sobreexpressió hepàtica de GK com a tractament de la diabetis de tipus 2 (diabetis induïda per dieta rica en greixos, resistència a insulina, obesitat), existeix el denominador comú que l'augment d'activitat GK al fetge condueix a una normalització de la glicèmia (Taula 11). La sobreexpressió hepàtica de la GK, mitjançant l'activació de la glicòlisi hepàtica i de la síntesi de glicogen, provocaria un augment de la *clearance* de glucosa i una disminució de la producció hepàtica de glucosa, que permetrien explicar la normalització de la glicèmia. La única excepció és el cas de l'estudi de Ferre *et al* [117], els quals demostren que un transgènic que expressa la GK sota el control de la PEPCK-C en ésser sotmès a una dieta rica en greixos esdevé ràpidament resistent a la insulina. Cal tenir en compte que en aquest estudi el transgen està controlat pel promotor de PEPCK-C (s'activa per glucagó i s'inhibeix per insulina), de manera que s'expressarà majoritàriament en situacions en què la GK no s'expressa fisiològicament.

La sobreexpressió hepàtica de GK té el risc d'incrementar la producció de malonil-CoA, de manera que s'activarien les vies lipogèniques i s'inhibirien les vies d'oxidació d'àcids grassos, amb conseqüències deletèries en els lípids circulants i/o possibilitat d'esteatosi hepàtica. Dels resultats presentats a la Taula 11, es fa difícil treure conclusions sobre aquest aspecte tant rellevant a l'hora de plantejar la GK com a teràpia efectiva per la diabetis de tipus 2. És interessant destacar l'estudi de Wu *et al* [356], en el qual malgrat haver-hi una disminució de l'oxidació d'àcids grassos al fetge, té lloc un augment de l'oxidació d'àcids grassos al múscul i de la despesa energètica, a conseqüència de la reducció de la glicèmia i la insulinèmia.

En aquest punt cal recordar l'estudi dels ratolins transgènics que expressaven tot el gen de la GK, amb el conseqüent control fisiològic de la seva expressió [269]. En sotmetre'ls a una dieta rica en greixos, aquests animals no desenvolupaven ni resistència a insulina ni diabetis de tipus 2 i, per altra

banda, no eren diferents dels controls pel què fa a la lipidèmia i no acumulaven lípids al fetge. Cal tenir en compte, que en aquests animals la GK també es sobreexpressava a les altres cèl·lules que contenen GK. Per tant, aquest estudi posa de manifest que el moment i el lloc d'expressió poden ésser importants a l'hora de determinar les conseqüències de l'increment de GK; així com també pot influir-hi la dosi del transgen.

Estudi	Desai et al	Ferre et al	Wu et al	Torres et al	Okamoto et al
Referències	[272]	[117]	[356]	[349]	[36]
Model animal:					
- Espècie	<i>M.musculus</i>	<i>M.musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>R.norvegicus</i>	<i>M.musculus</i>
- Pes/Edat inicial		4-8 setmanes	35 g	20 setmanes	
- Transf. gènica	Adenovirus	transgènic	Adenovirus	Ad + imsup	Adenovirus
- Esp. transgen	GK humana	GK de rata	GK de rata	GK de rata	GK de rata
- Promotor	RSV	PEPCK-C	CMV	CMV	
- Mod. diabetis	DRG (4 mesos)	DRG (12 set.)	obes. (KK/H1J)	DM2/ob (ZDF)	Pdk1 ^{-/-}
- Temps anàlisi	3 set. post-Ad	12 mesos	7 dies post-Ad	7 dies post-Ad	4 dies
- Estat anàlisi	dejuni (nit)	alimentació	dejuni (5h)	dejuni (6h)	dej. (16h)/alim.
Metabòlits sang:					
- glucosa	↓	=	↓	↓	↓ (dej. i alim)
- triglicèrids	=	-	↑	↑	↑ (alim)
- àcids grassos	=	-	↑	=	= (alim)
- lactat	=	-	-	↑	-
Hormones sang:					
- insulina	↓	↑	↓	=	↓ (dej.)
- leptina	-	-	↓	-	-
Metabòlits fetge:					
- glucosa-6-fosfat	-	-	↑	↑	↑ (alim)
- glicogen	↑	-	-	↑	↑ (dej. i alim)
- lactat	-	-	↑	-	-
- triglicèrids	=	↑	↑	-	-
Ingesta	↓	=	=	-	-
Pes	↓	↑	↓	-	-
Efectes sobre vies, enzims i factors de transcripció hepàtics (mRNA):			↓ oxidació àc. grassos ↑ lipogènesi (ACC1, FAS) ↑ glicòlisi ↓ AMPK	↓ producció hepàtica de glucosa ↑ cicle de glucosa	Dejuni: ↓ PGC-1α ↓ PEPCK-C = Glc6Pasa Alimentació: = SREBP-1c ↑ L-PK ↑ FAS = SCD-1

Taula 11. Estudis de sobreexpressió hepàtica de GK en models animals de resistència a insulina, obesitat i diabetis de tipus 2. "RSV" significa Rous sarcoma virus; "CMV" significa citomegalovirus; "Ad + im", adenovirus amb tractament immunosupressor; "DRG-(HFD)", dieta rica en greixos; "obes. (KK/H1J)", soca de ratolins anomenada KK/H1J que és un model d'obesitat; "DM2/ob (ZDF)", rates Zucker (Zucker diabetic fatty rats) que són un model de diabetis tipus 2 i obesitat; "Pdk1^{-/-}", model de ratolins transgènics amb resistència hepàtica a la insulina ja que la tenen genosuprimint el gen Pdk1, imprescindible per a la senyalització d'insulina al fetge; "alim", estat d'alimentació; "dej.", estat de dejuni; "↓", disminució significativa; "↑", augment significatiu; "~↓" i "~↑", tendència a la disminució o a l'augment, respectivament; "=" sense variació respecte els controls; "-" no determinat. En vermell es mostren els criteris de divisió de la columna corresponent.

B. Activadors sintètics de la GK (GKAs)

A la dècada dels 90s, el reconeixement que la GK juga un paper principal en el control de la glicèmia va conduir a programes de descobriment de fàrmacs per identificar petites molècules que tinguessin la GK com a diana per tractar la hiperglicèmia dels diabètics de tipus 2. L'objectiu fou buscar mimètics de la fructosa-1-fosfat (F1P) que poguessin bloquejar la inhibició de GK, revertint l'acció inhibidora de la GKRK coneguda al fetge i que se suposava que podia tenir algun paper en el pàncrees. No obstant, els compostos que es van identificar s'unien directament a la GK i l'activaven mitjançant la seva unió en una cavitat que presenta l'enzim en la conformació tancada. Aquesta troballa permeté demostrar que la GK pot presentar activació al·lostèrica, si bé, encara no s'han determinat quins poden ser-ne els activadors fisiològics.

El desenvolupament dels activadors va estar influït pel descobriment del lligament entre GK i PHHI (*persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of the infancy*) [246]. La síndrome era causada per una mutació activadora V455M de la GK. V455M provocava un increment de l'afinitat de l'enzim per a la glucosa mentre que les altres constants cinètiques estaven poc afectades per la mutació. Aquesta mutació natural va servir com un "*proof of concept*" convincent que els GKAs podien ésser desenvolupats com un fàrmac antidiabètic. Des d'aleshores s'han descrit fins a 13 mutacions activadores [144], totes elles situades en la mateixa cavitat de l'enzim on també s'uneixen els GKAs [136]. Aquesta cavitat, anomenada lloc al·lostèric, està constituïda pels residus aminoacídics 65-68 en la seva part superior, i els residus hidrofòbics Met235, Met210, Ile211, Val62 i Ile259 a la part inferior.

Amb aquestes bases, s'ha desenvolupat un programa de cerca de GKAs que implica a més d'una dotzena d'indústries farmacèutiques [144]. Com a dada anecdòtica, ja hi ha més de 100 patents publicades sobre aquestes molècules. Els GKAs actuals tenen unes estructures químiques molt diverses que es poden dividir en 4 grups (Figura 24):

- GKAs amb un àtom de carboni central: per exemple, RO0281675 (Roche), RO4389620 (Piragliatin; Roche), LY2121260 (Eli Lilly) i PSN-GK1 (OSI) [137, 357, 358].
- GKAs amb un anell aromàtic central: la majoria han estat desenvolupats per AstraZeneca, Pfizer i Banyu [180].
- GKAs amb un aminoàcid central, desenvolupats per Takeda.
- altres estructures excepcionals, com un anell pirrolona que ha desenvolupat Johnson & Johnson.

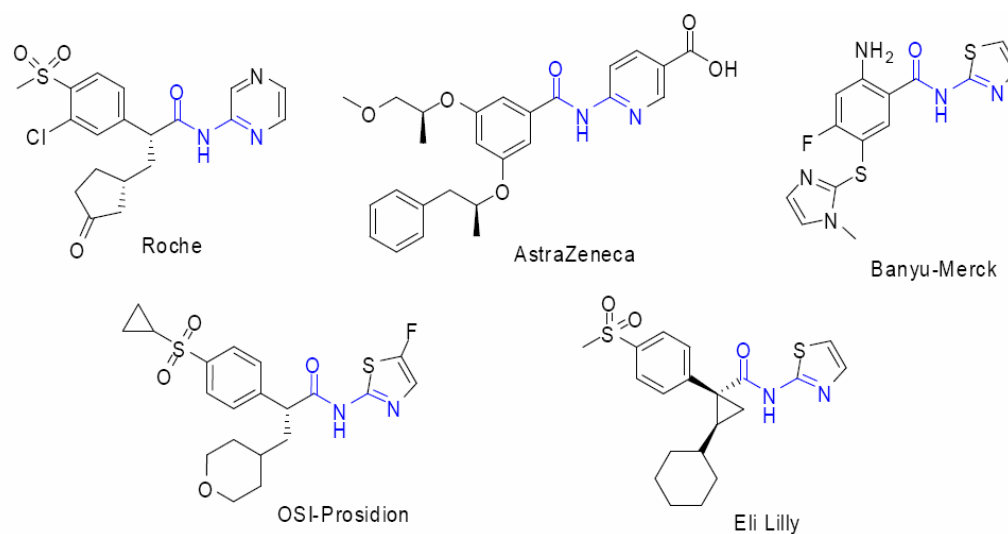


Figura 24. Estructures químiques d'alguns dels activadors sintètics de GK (GKAs).

B.1 Mecanismes moleculars d'acció dels GKAs

En unir-se al lloc al·lostèric de la GK, tots els GKAs analitzats fins el moment provoquen un augment de l'activitat GK mitjançant l'increment de l'afinitat per a la glucosa, és a dir, una disminució de la $S_{0.5}$. Però hi ha diversitat d'efectes sobre altres paràmetres cinètics: alguns GKAs no tenen efecte en la cooperativitat per a la glucosa o la V_{max} [180]; altres incrementen la V_{max} sense afectar la cooperativitat [137], altres aboleixen la cooperativitat [200], etc. Aquesta variabilitat també s'observa pels diferents tipus de mutacions activadores de la GK [262]. Per altra banda, els GKAs a l'igual que algunes mutacions activadores també poden afectar la inhibició de la GK per GKRP [200, 262].

L'explicació del comportament cinètic que presenta la GK unida als GKAs va lligada a l'estructura proteïca de l'enzim. Quan el GKA s'uneix al lloc al·lostèric de la GK provoca un canvi en l'equilibri de l'enzim des d'una conformació inactiva, amb baixa afinitat per a la glucosa, cap a la forma tancada amb alta afinitat per a la glucosa. Com a resultat, augmenta l'afinitat a la glucosa. La unió del GKA a la GK és alhora dependent de la concentració de glucosa, ja que la glucosa indueix un canvi conformacional en l'enzim que permet l'aparició del lloc d'unió al·lostèric on s'uneix el GKA. Per tant, existeix una interdependència entre la glucosa i els GKAs que representa un aspecte important de la regulació al·lostèrica de la GK: la pròpia acció dels GKAs està regulada endògenament pels nivells de glicèmia [136, 359]. Com que la GKRP només s'uneix a la forma súper-oberta (inactiva) de la GK, la unió dels GKAs a la GK i la conseqüent estabilització de la conformació tancada explicarien la desregulació de la GK hepàtica per GKRP.

B.2 Efectes farmacològics i terapèutics dels GKAs *in vivo*

Tots els efectes biològics coneguts dels GKAs són previsible a partir del paper central que juga la GK en la homeòstasi de glucosa i a partir dels efectes *in vitro* d'aquests compostos:

- **en preparacions de cèl·lules β pancreàtiques:** els GKAs estimulen la taxa glicolítica i abaixen el llindar de la secreció d'insulina estimulada per glucosa, és a dir, augmenta la secreció d'insulina a baixes concentracions de glucosa [137, 357, 358]. Aquest increment de la secreció d'insulina també s'ha vist en illots pancreàtics en cultiu provinents de donants humans sans i diabètics [360]. A més, s'ha reportat que l'activador LY2121260 (Eli Lilly) produeix un increment de la quantitat de GK en cèl·lules d'insulinoma, presumptament perquè en augmentar la quantitat de GK unida a glucosa s'afavoreix l'habilitat de la glucosa per establir l'enzim contra la degradació [357].
- **en preparacions d'hepatòcits:** els GKAs provoquen un augment de la síntesi de glicogen com a resultat de l'activació de la GK citosòlica per una banda i, per l'altra, d'estimular la dissociació del complex GKRP-GK [180, 200].

No obstant, el coneixement de les accions potencials dels GKAs sobre les altres cèl·lules que contenen GK és molt limitat.

Pel què fa als estudis dels efectes dels GKAs sobre l'organisme sencer [137, 357, 358, 361-363], s'obtenia una disminució de la glicèmia dosi-dependent. En la majoria de casos en què s'empraven animals diabètics o pacients humans, la normalització de la glicèmia estava associada amb un increment de l'índex insulínogènic, que consistia en una acció dual sobre la secreció d'insulina i la captació neta de glucosa al fetge (Taula 12). A més, l'administració de GKAs prevenia el desenvolupament de diabetis en un model animal d'obesitat induïda per la dieta en ratolins [137].

Compost (Companyia)	Número patent (Any)	Dades pre-clíniques i clíniques	Refs
RO0281675 (Hoffman-La Roche)	WO 0058293 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> - Augmenta la secreció d'insulina estimulada per glucosa en illots pancreàtics aïllats de rata i de ratolí. - Disminueix la glicèmia fins a rangs hipoglicèmics i normoglicèmics en models animals sans i diabètics, respectivament, mitjançant l'estimulació de la secreció d'insulina i la reducció de la producció hepàtica de glucosa. 	[137]
RO4389620 o Piragliatin (Hoffman-La Roche)	WO 2007115968 (2007)	<ul style="list-style-type: none"> - Ha arribat a la fase 2 d'assajos clínics, en assajos de monoteràpia i en combinació amb metformina. - Disminueix la glicèmia en voluntaris sans i pacients amb diabetis de tipus 2. En els pacients, provoca una millora en els tests de tolerància a glucosa via l'increment de la secreció d'insulina, la captació de glucosa i la disminució de la producció hepàtica de glucosa. - Els assajos s'han aturat per raons desconegudes. 	[361]
LY2121260 (Eli Lilly)	WO 20040631 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> - Potencia la secreció d'insulina estimulada per glucosa en illots de rata aïllats i augmenta el contingut de GK en cèl·lules INS-1. - Estimula la captació de 2-deoxi-D-³H-glucosa en hepatòcits de rata en cultiu. - Disminueix el perfil de glucosa en un test de tolerància a glucosa en rates Wistar sanes. 	[357]
PSN-GK1 (OSI)	WO 2004072031 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> - Estimula la secreció d'insulina. - Augmenta la síntesi hepàtica de glicogen sense augmentar els nivells hepàtics de glicogen. 	[358]
GKA-50 (Astra-Zeneca)	WO 2005044801 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> - Permet obtenir una disminució de la glicèmia proporcional a la funció linial del logaritme de les concentracions d'activador no unit dividit per la potència activadora d'aquests compostos <i>in vitro</i>, la qual cosa és important a l'hora de testar aquest activador en estadis pre-clínics. 	[364]

Taula 12. Informació disponible de les dades pre-clíniques i clíniques d'alguns activadors sintètics de GK (GKAs).

B.3 Limitacions i potencials de les teràpies basades en GKAs

Les dades biològiques disponibles sobre l'eficàcia dels GKAs en disminuir la glicèmia i millorar la tolerància a glucosa *in vivo* són molt prometedores de cara a la teràpia de la diabetis. La qüestió clau és saber si l'ús terapèutic crònic dels GKAs pot tenir efectes indesitjables.

En primer lloc, els estudis amb GKAs *in vivo* (recolzats per les dades obtingudes en pacients afectats de PHHI) demostren que existeix un risc d'hipoglicèmia inherent a l'augment d'insulinèmia i de

captació de glucosa que genera l'activació de la GK. Per aquest motiu seria aconsellable dissenyar GKAs amb un rang terapèutic que eliminés o disminuís aquest risc.

En segon lloc, l'activació simultània de la GK a les diferents cèl·lules on s'expressa pot tenir algunes conseqüències que encara no s'han previst. En cas que passessin la barrera hematoencefàlica, l'administració central d'un GKA podria afectar circuits neuronals a l'hipotàlem que generessin canvis en els patrons de regulació de la gana i de despesa energètica, com a conseqüència de tenir constantment activats els sensors de glucosa cerebrals malgrat la manca d'ingesta calòrica. Per altra banda, l'activació de la GK a les cèl·lules gonadotropes de la glàndula pituïtària podrien afectar la fertilitat o determinades funcions gonadals. En general, el fet que el sistema de regulació de l'homeòstasi de glucosa sigui complex i interrelacionat fa que sigui difícil destriar els efectes específics dels GKAs sobre cada tipus cel·lular (Figura 25).

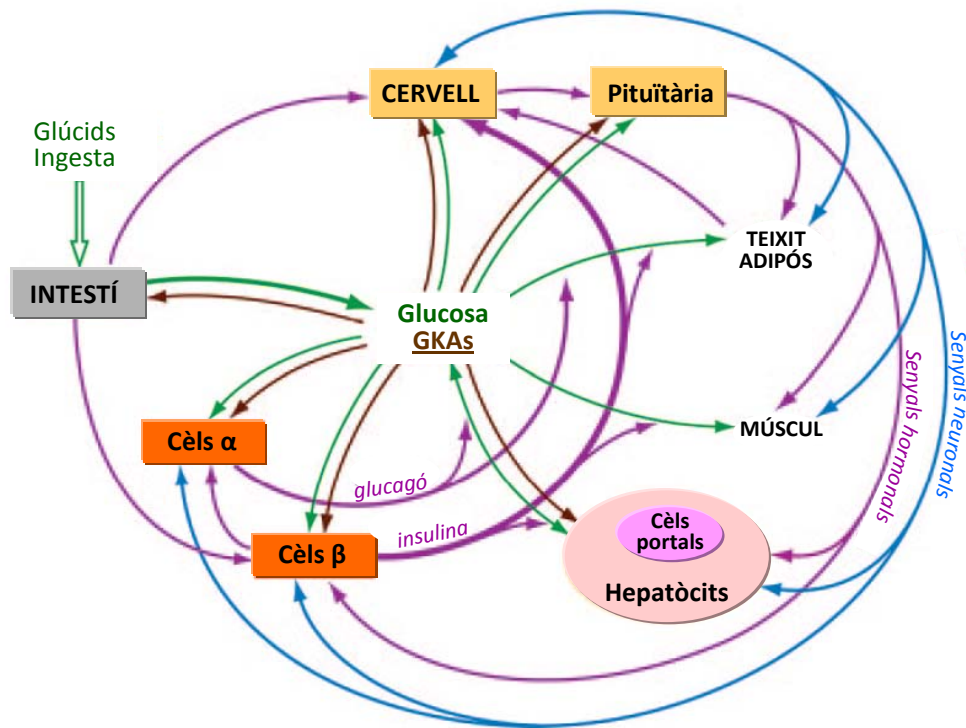


Figura 25. Representació de l'acció dels GKAs en la xarxa de cèl·lules que expressen GK i intervien en la regulació de l'homeòstasi de glucosa. La glucosa per si sola (fletxes de color verd) o amb l'ajuda dels GKAs (fletxes de color marró) actua sobre la GK en una gran varietat de cèl·lules/teixits que expressen aquest enzim (indicats en requadres o el·lipses de color). El resultat és una senyalització secundària a través d'hormones (fletxes de color rosa-lila) o del sistema nerviós autònom (fletxes de color blau) que impacta sobre l'homeòstasi de glucosa. (Figura adaptada de l'article de Matschinsky et al [122]).

El tercer risc de l'ús dels GKAs ve donat per la localització *upstream* de la GK en les vies metabòliques. En el cas del fetge, podria haver-hi un gran augment del contingut de glicogen hepàtic però la preocupació principal és la possibilitat que els GKAs puguin produir esteatosi hepàtica i hiperlipidèmia, tal i com succeïa en alguns models de sobreexpressió de GK al fetge [117, 270, 354].

No obstant, el fet que l'activació de la GK pels GKAs no sigui exclusiva del fetge (amb alteracions d'insulinèmia i altres vies hormonals i neuronals que incideixen també en el metabolisme hepàtic), conjuntament amb el fet que els pacients de PHHI no presentin un perfil lipídic alterat, fa pensar que els GKAs no predisposarien a una alteració perjudicial del metabolisme lipídic. No obstant, és molt important obtenir aquesta informació en els assajos clínics en pacients de diabetis de tipus 2 de cara a confirmar la validesa dels GKAs com a fàrmacs anti-diabètics.

Finalment, un altre perill de l'ús a llarg termini dels GKAs seria a causa de la seva acció insulinoatròfica a la cèl·lula β pancreàtica. L'activitat hipersecretora d'insulina que els GKAs hi indueixen podria resultar en un increment de l'estrès cel·lular precipitant la cèl·lula β a la mort cel·lular, amb el conseqüent agreujament de l'estat diabètic (tal com succeeix amb un tractament crònic amb sulfonilurees) [365].

A part de la possibilitat d'efectes indesitjables, cal tenir en compte que s'han de complir alguns requisits per tal que la GK sigui una diana efectiva per als GKAs en casos de diabetis de tipus 2. El principal és que hi ha d'haver una expressió suficient de la GK endògena per tal que els GKAs puguin promoure un increment substancial de la capacitat fosforiladora de glucosa. També cal que l'estat patològic de la diabetis no hagi alterat suficientment els mecanismes de control de la senyalització i utilització de glucosa als diferents teixits on s'expressa la GK, de manera que els increments en l'activitat GK causats pels GKAs es corresponguin en canvis en el flux de glucosa i en respostes que ajudin a la millora del fenotip diabètic.

En comparació amb altres fàrmacs del mercat, els GKAs tenen l'avantatge que actuen sobre una diana única i coneguda. D'igual importància és el fet que l'acció de fàrmacs que actuen sobre la cèl·lula β pot ésser potenciada pels GKAs. Per exemple, la combinació amb exendina 4 o inhibidors de DPP4 són interessants perquè les seves accions són totalment dependents de la senyalització de glucosa a la cèl·lula β . Un altre argument a favor de la teràpia combinatòria amb inhibidors de DPP4 i anàlegs de GLP1 és que tenen un efecte anti-apoptòtic que podria prevenir la pèrdua progressiva de les cèl·lules β característica del progrés de la diabetis de tipus 2 [144].

Malgrat les altes esperances i esforços que s'estan aplicant en el desenvolupament dels GKAs, el coneixement del seu mecanisme d'acció i de les seves accions biològiques encara és parcial. No obstant, la disponibilitat d'un elevat nombre de GKAs diferents i la informació que generaran en ésser aplicats en models *in vivo* i en assajos clínics permetrà respondre molts dels interrogants. Quin és el paper de la GK en les cèl·lules α pancreàtiques o a les cèl·lules L intestinals, en la generació del senyal portal, en les neurones hipotalàmiques i en les cèl·lules gonadotropes? Quin és l'impacte

terapèutic relatiu dels GKAs sobre el fetge i sobre les cèl·lules β , i com aquest impacte pot estar afectat pels diferents estats de la diabetis de tipus 2? Poden ésser realment útils les teràpies combinatòries dels GKAs amb altres fàrmacs anti-diabètics?

Reflexió final

La glucoquinasa és un enzim glicolític clàssic, en el sentit que ja es va descriure a mitjans dels anys 60. Des d'aleshores ha estat subjecte de múltiples estudis que han permès que a dia d'avui coneguem la seva estructura, les seves propietats cinètiques, les cèl·lules en què s'expressa i la seva localització intracel·lular, amb quines proteïnes interacciona, els senyals nutricionals i hormonals que regulen la seva expressió, els senyals que la pròpia activitat glucoquinasa promou dins de la cèl·lula i, fins i tot, quines patologies apareixen quan hi ha un excés o una manca d'aquest enzim.

D'entrada, tot suggereix que la glucoquinasa és un enzim perfectament caracteritzat. Ara bé, quan hom revisa tota la bibliografia s'adonarà que encara queden moltes preguntes obertes. Per exemple:

- *Existeixen dos models d'animals transgènics que sobreexpressen glucoquinasa específicament al fetge. El fenotip que presenten al final d'un estudi a llarg termini és completament diferent (mentre uns esdevenen obesos i resistents a la insulina els altres presenten una disminució en l'índex de massa corporal).*
- *S'han observat discrepàncies en el fenotip metabòlic obtingut en els diferents estudis de sobreexpressió de glucoquinasa. Cal tenir en compte que els mètodes de transferència gènica i els models animals usats varien d'un estudi a l'altre, la qual cosa pot comportar divergències en els resultats obtinguts. Però aquest fet també referma el concepte que la GK és un element clau en la homeòstasi metabòlica, en el sentit que segons quina sigui la modulació de la GK els resultats obtinguts són diferents i no sempre previsibles.*
- *És curiós pensar que tant la manca d'expressió de GK com la sobreexpressió de GK al fetge provoca problemes d'esteatosi hepàtica. Per què? De tota manera aquest fet indica que l'activitat d'aquest enzim glicolític clàssic també determina el metabolisme lipídic cel·lular.*
- *Es coneix que la GGRP és una proteïna reguladora molt important en el fetge perquè segresta la GK al nucli. Però encara no ha estat possible esbrinar per quin mecanisme entra la GK al nucli. També existeixen diferències entre estudis pel què fa a la GGRP, surt o no surt del nucli? I si surt, com entra el complex GK-GGRP al nucli?*
- *Està clàssicament establert que la insulina regula la transcripció de la GK al fetge; ara bé, no està definit a través de quin factor de transcripció actua. Molts estudis indiquen que el mitjancer de la insulina seria SREBP-1c; mentre que d'altres demostren que pot ser SREBP-1c però que la seva activació és molt tardana respecte el senyal d'insulina i el*

temps en què s'inicia la transcripció de GK. Aquest fet semblaria indicar que existeix algun altre factor que activaria GK en un temps més curt al senyal d'insulina; però, quin?

- *Gràcies als estudis d'estructura i el descobriment dels activadors sintètics de la GK, se sap que aquest enzim presenta un lloc d'unió al·lostèrica que determina una determinada conformació més activa d'aquest enzim. Però encara no es coneix si existeixen lligands naturals per aquest lloc al·lostèric.*
- *Finalment, tots els estudis coincideixen en el concepte que la GK és un enzim clau en la homeòstasi de glucosa. Si hom pensa a nivell d'organisme, en què tota una xarxa de factors i senyals controlen les cèl·lules especialitzades dels diferents teixits, en quin punt és important la GK? Existeixen mecanismes de senyalització entre els diferents teixits sensors de glucosa que contenen GK? Quins?*

Totes aquestes preguntes fan que la GK sigui un enzim que genera interès en el present. A més, diverses empreses farmacèutiques estan estudiant els activadors sintètics de la GK com a teràpia per a la diabetis. Ambdós fets garanteixen molts més projectes científics sobre aquest enzim en el futur.

OBJECTIUS

Podrán cortar todas las flores,
pero no podrán detener la primavera.

Pablo Neruda

La GK té un paper important en la regulació del metabolisme glucídic del fetge ja que la seva activitat provoca un augment de les vies d'emmagatzematge i d'oxidació de glucosa, alhora que inhibeix la producció hepàtica de glucosa. Aquesta funció de la GK està recolzada per diversos estudis de sobreexpressió d'aquest enzim al fetge. Tal i com s'ha posat de manifest en la introducció d'aquest treball, els diversos models de sobreexpressió de GK generen resultats heterogenis que podrien venir donats per diferències en el model animal, en el tipus de transferència gènica, en els promotors que dirigeixen l'expressió i en la dosi del transgen. De totes aquestes variables, ens hem plantejat avaluar si el lloc d'expressió del transgen (zona perivenosa, zona periportal, etc) influeix en el fenotip.

Amb aquesta finalitat vam optar per un model de sobreexpressió de GK majoritàriament als hepatòcits perivenosos (on s'expressa majoritàriament l'enzim en condicions fisiològiques), per avaluar l'efecte d'aquesta sobreexpressió en el metabolisme hepàtic d'animals sans i diabètics, i comparar els resultats amb altres models animals que presenten una expressió periportal o bé transparenquimal del transgen. Per desenvolupar el model ens vam fixar els objectius següents:

1. Obtenció i comprovació *in vitro* dels vectors d'expressió que s'emprarien *in vivo*: pCAGGs/GK (pGK) i pCpG/GK.
2. Ús del mètode de transferència de DNA nu al fetge per injecció hidrodinàmica en models animals *in vivo*.
3. Avaluació de la sobreexpressió de pGK i pCpG/GK en el fetge perivenós de ratolins sans, tant a curt com a llarg termini (2 i 50 dies, respectivament). L'interès d'aquest punt rau en avaluar si la sobreexpressió de la GK al fetge desencadena resistència a insulina tal i com succeeix en alguns estudis.
4. Avaluació de la sobreexpressió de pGK i pCpG/GK en el fetge perivenós en el context de la diabetis, per determinar si la sobreexpressió zonal pot ésser una estratègia terapèutica que no alteri el metabolisme lipídic com esdevé en altres estudis en què no es té en compte la zonació de l'expressió de la GK. Concretament, s'empraren ratolins amb diabetis de tipus 1 induïda amb estreptozotocina (STZ).

Per altra banda, amb el desenvolupament dels activadors sintètics de la GK (GKA) s'han ampliat les esperances pel tractament de la diabetis de tipus 2. No obstant, no queda clara quina és l'acció individual dels GKAs al fetge, independentment de la influència dels GKAs en altres teixits. Per intentar indagar quins serien els efectes específics de l'activació de la GK al fetge, ens vam proposar la sobreexpressió d'una forma de GK amb una mutació activadora que confereix unes característiques

cinètiques a l'enzim idèntiques a les obtingudes amb els GKAs. Per altra banda, també ens proposarem avaluar-ne l'efectivitat sobre el fenotip diabètic, com a tractament alternatiu als GKAs sistèmics, la qual cosa seria interessant per evitar la sobrecàrrega que exerceix la seva acció secretagoga d'insulina a la cèl·lula β . Els objectius concrets per desenvolupar aquest model són els següents:

5. Introducció de la mutació A456V en el gen de la GK de rata, mitjançant tècniques de mutagènesi dirigida.
6. Obtenció i comprovació *in vitro* dels vectors d'expressió pCAGGs/GK_{A456V} i pCpG/GK_{A456V}.
7. Avaluació de l'expressió hepàtica dels vectors pCAGGs/GK_{A456V} i pCpG/GK_{A456V} en animals sans.
8. Avaluació de l'expressió hepàtica dels vectors pCAGGs/GK_{A456V} i pCpG/GK_{A456V} en el context de la diabetis, concretament en animals amb diabetis de tipus 1 induïda amb estreptozotocina.

En última instància, la realització d'aquests estudis podria permetre avaluar si la sobreexpressió de la GK i l'activació de la GK al fetge tenien efectes diferents sobre el metabolisme, els quals permetessin estudiar quina seria una estratègia millor per a la teràpia de la diabetis

RESULTATS

*Tinc una pedra a les mans.
Cada nit
La deixo caure al pou profund del son
I la'n trec l'endemà xopa de vida.*

Miquel Martí i Pol

CAPÍTOL 1

SOBREXPRESSION DE GK A LA ZONA PERIVENOSA DEL FETGE

INTRODUCCIÓ

Vistes les discrepàncies sobre els efectes de la sobreexpressió de GK al fetge que existeixen a la bibliografia (s'han descrit al capítol introductori d'aquesta tesi), ens vam proposar l'objectiu de considerar el concepte de zonació hepàtica en els nostres estudis de sobreexpressió i, per tant, sobreexpressar el transgen a la zona perivenosa del fetge que és on es troba majoritàriament la GK endògena. Vam emprar dos models animals: per una banda, ratolins sans i, per l'altra, ratolins amb diabetis de tipus 1 per tal d'avaluar les possibilitats terapèutiques de la sobreexpressió perivenosa de la GK.

Per delimitar la zona de transfecció del transgen als hepatòcits propers a la vena central vam emprar el mètode d'**injecció hidrodinàmica de plasmidis nus**. La transferència gènica hidrodinàmica es basa en l'aplicació de pressió hidrodinàmica controlada sobre els capil·lars per tal de potenciar la permeabilitat cel·lular dels endotelis i del parènquima. La primera demostració que la pressió hidrostàtica pot incrementar l'eficiència en la transferència gènica als hepatòcits *in vivo* la va donar Budker *et al.* el 1996 [366] mitjançant una injecció intraportal d'un mil·lilitre de solució en ratolins. La injecció hidrodinàmica a la vena caudal va ésser descrita per primera vegada per Liu *et al.* [339] seguit molt a prop per Zhang *et al.* [367], i s'ha convertit en el mètode estàndard de transfecció hidrodinàmica del fetge de ratolins (*Mus musculus*). Consisteix en una injecció ràpida (entre 5 i 8 segons) a la vena caudal d'una solució salina, el volum de la qual representa el 8-10% del pes corporal i que conté DNA nuu. Permet assolir una transducció transitòria de fins un 40% dels hepatòcits, tot i que també es transdueixen altres òrgans (ronyó, pulmó, melsa i cor) amb una eficiència 4-5 ordres de magnitud inferior.

Estudis cinètics i de biodistribució demostren que si s'injecta el DNA via injecció intravenosa de baix volum, el DNA és degradat ràpidament per les nucleases plasmàtiques i s'acumula a les cèl·lules hepàtiques no parenquimals [340]. En canvi, amb una injecció hidrodinàmica, tot i tenir una cinètica similar, s'obté una ràpida internalització del DNA als hepatòcits [339]. Mecanísticament, el volum injectat a la vena caudal desemboca a la vena cava, arriba al cor on el flux injectat sobrepassa la capacitat cardíaca i en conseqüència es crea un increment de pressió venosa que resulta en un flux retrògrad cap al fetge a través de la vena hepàtica [368-370]. El fetge - tant per la seva estructura flexible que li permet assimilar grans volums, com per la peculiaritat que els seus capil·lars tenen epitelis fenestrats - és el màxim receptor del volum injectat i, per tant, del DNA (Figura 26). Diversos estudis de microscòpia, per part del nostre grup i altres, han demostrat que les cèl·lules hepàtiques que majoritàriament es

transfecten estan localitzades al voltant de la vena hepàtica, per on arriba el reflux de la solució salina injectada hidrodinàmicament [345, 368, 371].

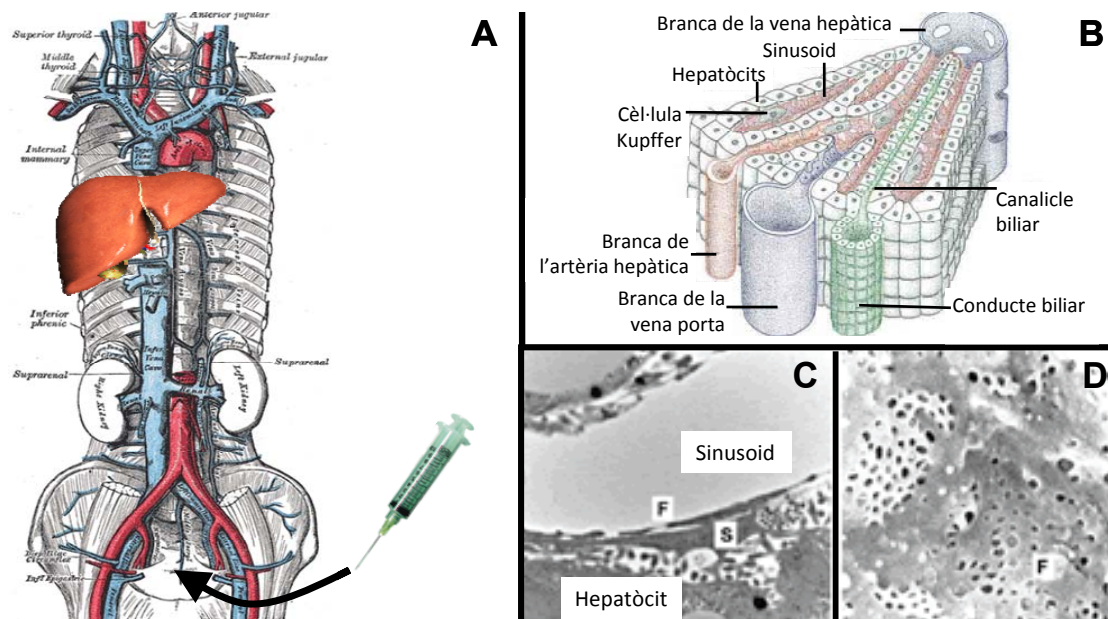


Figura 26. Injecció hidrodinàmica a la vena caudal per transfectar el fetge perivenós. La transferència gènica hidrodinàmica aprofita la força generada per una injecció ràpida d'un gran volum de solució que conté DNA per permeabilitzar l'endoteli del capil·lar sanguini i generar porus a la membrana plasmàtica de les cèl·lules parenquimals. L'eficiència de la transfecció ve determinada per l'estructura capil·lar, per l'arquitectura de les cèl·lules que envolten el capil·lar i per la pressió hidrostàtica que rep el vas sanguini. Els capil·lars fenestrats o sinusoids presents al fetge són més sensibles al procés hidrodinàmic que els capil·lars amb epiteli continu, perquè presenten espais entre les cèl·lules endotelials adjacents i a més gairebé no tenen làmina basal. **(A)** Esquema representatiu de la tècnica d'injecció hidrodinàmica. **(B)** Dibuix simbòlic d'un fragment de lòbul hepàtic per tal de recordar l'arquitectura del fetge. **(C)** Imatge de microscòpia electrònica de transmissió (x 20.000) d'un tall de fetge de rata AL on es mostra la proximitat que existeix entre el sinusoid i els hepatòcits. [S] simbolitza una cèl·lula estelada i [F], fenestracions. **(D)** Micrografia electrònica d'escaneig (x 25.000) on es poden apreciar en detall les fenestracions de l'epiteli sinusoidal. (Les imatges C i D han estat adaptades a partir de Hamish et al. *Exp Gerontol.* 2007 April 42(4): 374-378).

El procés exacte pel qual el DNA entra als hepatòcits no ha estat encara del tot dilucidat. Alguns laboratoris han demostrat que la injecció hidrodinàmica indueix la formació de vesícules intracel·lulars a l'hepatòcit [369]; altres han explicat la introducció del DNA a l'hepatòcit via receptor de DNA [372] i altres, per macropinositosis [369, 373]. No obstant, la majoria d'indícis apunten a què l'entrada als hepatòcits està mitjançada per un procés físic no específic [374] batejat com a "hidroporació" per Zhang i col·laboradors [370] en el qual l'alta pressió provocada per la injecció causaria petits porus a la membrana dels hepatòcits fent-los hiperpermeables al DNA [375].

Els animals sobreviuen bé després d'una injecció hidrodinàmica a la vena de la cua, encara que els ocasioni una disfunció temporal del sistema cardíac promoguda per la sobrecàrrega de

fluid, un increment agut de la pressió sanguínia a través del fetge i una expansió de la mida del fetge amb la consegüent deformació estructural de l'òrgan. El fetge expandit recupera la seva mida normal en aproximadament 30 minuts, mentre que els porus de la membrana es segellen en menys de 2 minuts i els sinusoids lesionats es recuperen en 24-36 hores després de la injecció hidrodinàmica. Aquest cert grau de dany hepàtic agut es reflecteix en un increment de transaminases sèriques, però ràpidament (al segon dia després de la injecció) torna a nivells basals. Els ratolins injectats hidrodinàmicament presenten una taxa de creixement igual que la dels controls no injectats.

Per altra banda, els nivells d'expressió del transgen assolits amb la injecció hidrodinàmica de DNA nuu són alts en comparació amb altres tècniques no virals. Aquestes discrepàncies poden ésser atribuïdes a canvis biològics induïts pel procés d'injecció ja que s'ha demostrat recentment que la injecció hidrodinàmica de solucions isotòniques augmenta l'expressió del mRNA de *c-fos* i de *c-jun*, i en conseqüència s'activen factors de transcripció com la proteïna activadora AP-1 i el factor nuclear NF-κB [376].

Comparat amb altres mètodes no virals, el mètode de transferència gènica hidrodinàmica resulta molt atractiu en termes d'eficiència, reproduïbilitat i simplicitat. Les aplicacions més destacables de la transferència gènica hidrodinàmica inclouen, sobretot, l'avaluació del potencial terapèutic de determinats gens *in vivo*, (especialment proteïnes de secreció, convertint el fetge en una plataforma productora de la potencial proteïna terapèutica), l'estudi de nous vectors i elements de transferència gènica, així com l'ús de la metodologia per a l'estudi de la transferència d'elements no plasmídics, entre els que s'inclouen els siRNA i els vectors de shRNA, que ja ha estat aplicada en models murins amb finalitats terapèutiques *in vivo* [340, 377]. Fins i tot, s'ha utilitzat la injecció hidrodinàmica per afavorir l'eficiència de transducció de vectors virals [378, 379].

Finalment, cal esmentar que la tècnica hidrodinàmica té un gran potencial ja que, a més de les seves aplicacions per transfectar el fetge de ratolins, existeixen diferents adaptacions de la metodologia hidrodinàmica que s'han testat per a transfectar el fetge d'animals més grans (rata, gos, fins i tot humans) i també per a transfectar altres òrgans (múscul, miocardi, ronyó, melsa) [380].

1. SOBREPRESSIÓ DE GK AL FETGE PERIVENÓS DE RATOLINS SANS

Primerament, per visualitzar la zona del fetge que es transfectava mitjançant una injecció hidrodinàmica, vam injectar ratolins sans amb un vector que codificava per a la proteïna verda fluorescent (GFP). 48 hores post-injecció es van obtenir seccions del fetge i es van observar sota el microscopi de fluorescència. A la figura 27 A, es mostra que al fetge hi ha grups d'hepatòcits que expressen GFP, és a dir, no s'observa un marcatge homogeni com també succeïa en els estudis de Liu *et al* i Kobayashi *et al* [339, 375]. Per discernir si els grups d'hepatòcits estaven a la zona perivenosa, vam utilitzar la tècnica d'immunohistoquímica per detectar l'enzim PEPCK-C el qual és un marcador periportal. Tal i com es pot observar a la figura 27 B i C, la zona de transfecció amb GFP està totalment separada de la zona de màxim marcatge de PEPCK-C, de manera que vam poder afirmar que amb la injecció hidrodinàmica assolíem una transfecció exclusiva dels hepatòcits perivenosos.

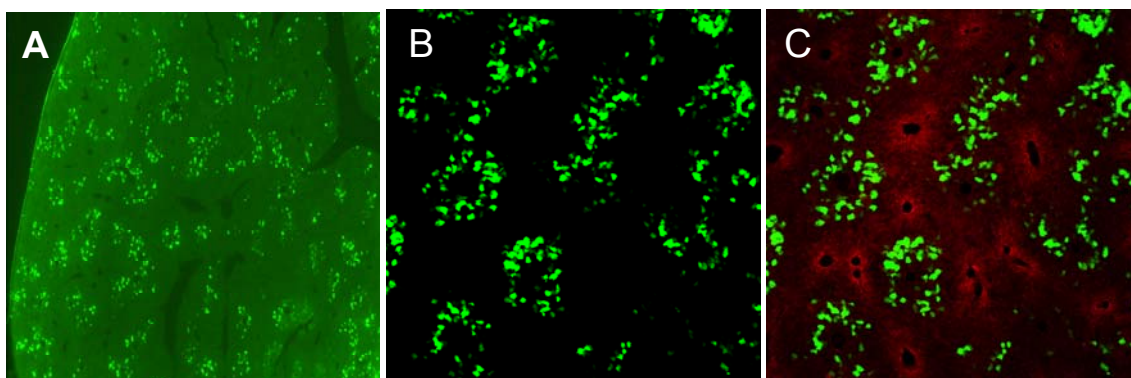


Figura 27. Transfecció dels hepatòcits perivenosos assolida amb la injecció hidrodinàmica. Ratolins ICR (CD1) van ésser injectats amb 30 µg de pEGFP i perfosos amb una solució de 4% PFA 48 hores després. (A) Es mostra la visualització directa de GFP (verd) sobre les seccions de fetge de 50 µm, per microscòpia de fluorescència. (B) Secció de fetge observada en el microscopi confocal (200X). (C) Col·localització de la immunodetecció de PEPCK-C (fluorescència vermella) i GFP en fetge injectat hidrodinàmicament, observada en microscopi confocal (200X).

Obtenció del vector pGK i avaluació de la seva capacitat de transfecció in vitro

Per sobreexpressar la GK en el fetge de ratolins, ens calia clonar el gen de la GK de rata en un vector d'expressió constitutiva que permetés alts nivells d'expressió del transgen *in vivo*. Vam escollir el vector pCAGGs [381], el qual dirigeix l'expressió del transgen amb un promotor AG (*Chicken β-actin/Rabbit β-globin hybrid promoter*) i un potenciador CMV-IE (*Human*

cytomegalovirus immediate early promoter, enhancer only), i està descrit a la bibliografia que assoleix un alt grau d'expressió gènica *in vivo* (Fig 28).

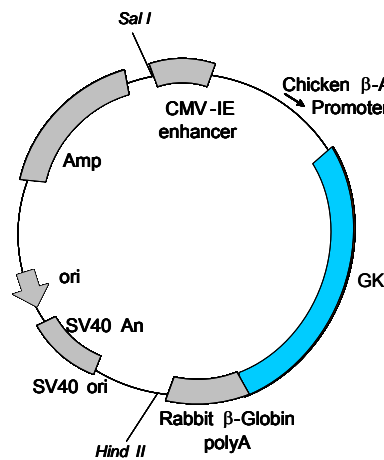


Figura 28. Estructura del plasmidi pCAGGs/GK (pGK)

Elements per expressió en *E. coli*:

- Origen de replicació del plasmidi pMB1 d'*E. Coli*.
- Origen bidireccional del virus de simis 40 (SV40)
- Promotor de l'operó lac d'*E. coli*
- Marcador de selecció: gen de resistència a ampicil·lina

Elements per expressió en cèl·lules de mamífer:

- Promotor híbrid de β-actina de pollastre i β-globina de conill (AG)
- Potenciador del citomegalovirus humà (CMV-IE).
- Senyal de poliadenilació de la β-globina de conill (β-globin polyA)
- Senyal de poliadenilació del SV40

El cDNA de la GK de rata fou clonat en un vector pCAGGs amb EcoRI-BglIII per obtenir la construcció pGK. Abans de començar els estudis *in vivo*, vam verificar *in vitro* que la construcció pGK podia expressar correctament la proteïna GK. Amb aquesta finalitat vam transfectar cèl·lules Huh7 amb pGK i, passades 48 hores de la transfecció, es va avaluar el contingut proteic de GK per *Western blot* (Figura 29 A) i es va determinar l'activitat GK dels homogenats cel·lulars per assegurar-nos que la proteïna sobreexpressada era funcional (Figura 29 B).

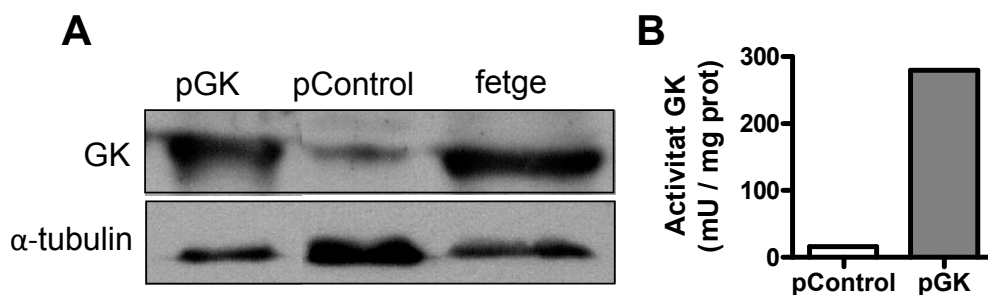


Figura 29. Sobrexpressió *in vitro* del vector pGK. Cèl·lules Huh7 van ésser transfectades amb els plasmidis pCAGGs (pControl) i pGK mitjançant PEI. Passades 48 h, es va confirmar la sobrexpressió de GK per *Western blot* (A) i per determinació de l'activitat enzimàtica dels homogenats cel·lulars (B).

Sobrexpressió de pGK al fetge perivenós de ratolins

La sobrexpressió de GK al fetge teòricament promou una major captació hepàtica de glucosa, de manera que un dels efectes fenotípics esperats és la disminució de glicèmia. Com a primera aproximació per avaluar si la injecció hidrodinàmica de pGK es reflectia en canvis de

concentració de glucosa en sang, vam injectar dues dosis diferents de DNA (30 i 100 µg) a ratolins de la soca ICR (CD1). Vam obtenir efecte fenotípic de baixada de glicèmia a les 24 h post-injecció. L'efecte fou major amb la dosi baixa de pGK, probablement perquè altes concentracions de DNA poden generar major toxicitat cel·lular a curt termini (Figura 30).

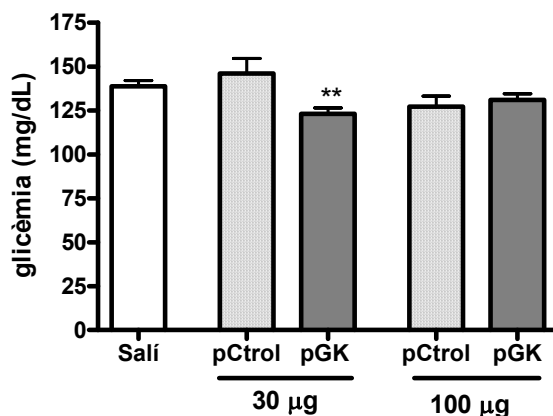


Figura 30. Avaluació dels efectes de la sobreexpressió de diferents dosis de pGK sobre l'homeostasi de glucosa en ratolins ICR sans a les 24 h post-injecció en situació d'alimentació. Els valors representen la mitjana ± error estàndard (n = 7 - 12 per a la dosi baixa i n = 4 per a la dosi alta) ** p<0.01 vs pCtrl i vs Salí, determinat per t-Student. Els grups controls no presenten diferències significatives entre ells, determinat per one-way ANOVA.

Si repetíem l'experiment per avaluar la glicèmia i la insulinièmia en estat d'alimentació i de dejuni a les 24 h post-injecció, observàvem que en estat d'alimentació es reproduïa l'efecte sobre la glicèmia i anava acompanyat d'una disminució significativa de la insulinièmia en el grup de ratolins injectats amb pGK (Taula 13). No obstant, aquestes baixades significatives de glicèmia i insulinièmia es perdien després de 8 h de dejuni.

		Glicèmia (mg/dL)	Insulinièmia (µg/L)
Alimentació	Solució salina	138.7 ± 3.448	1.312 ± 0.085
	pGK	123.1 ± 3.432 *	0.944 ± 0.070 *
Dejuni (8 h)	Solució salina	105.5 ± 18.5	0.850 ± 0.076
	pGK	100.2 ± 6.507	0.746 ± 0.059

Taula 13. Els valors corresponen a la mitjana ± error estàndard (n=5-7). * p<0.05 vs control, determinat per t-Student.

Ara bé, aquests experiments, conjuntament amb diversos experiments preliminars ens van demostrar que els efectes de disminució de glicèmia només es presentaven a les 24-48 h post-injecció. Aquest fet ens conduí a avaluar si els nivells d'expressió del transgen es perdien

ràpidament amb el temps. Mitjançant qRT-PCR vam mesurar els nivells de mRNA de la GK de rata a dia 2 i a dia 18 post-injecció i, tal com es mostra a la figura 31, vam confirmar una caiguda dràstica d'expressió, com era d'esperar per les característiques de la injecció hidrodinàmica.

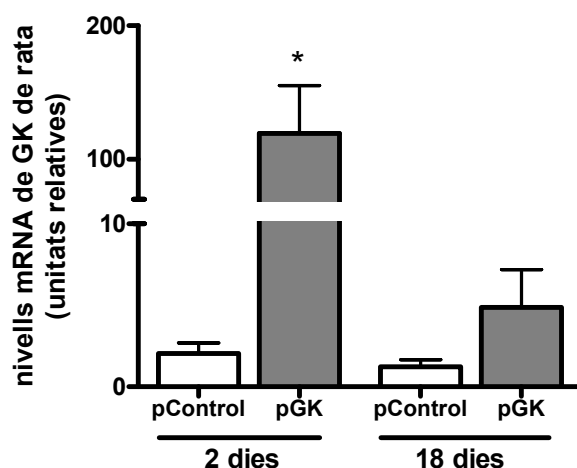


Figura 31. Avaluació de l'expressió de la construcció pGK en el fetge de rata a dia 2 i a dia 18 post-injecció. Les columnes representen la quantificació per qRT-PCR dels nivells de mRNA de la GK de rata en els fetges de ratolins ICR sans en els dies post-injecció indicats. Es mostra la mitjana \pm error estàndard. * $p < 0.05$ vs pControl determinat per t-Student ($n=4-12$).

A dia 18 post-injecció s'observà un augment (x4) no significatiu dels nivells de mRNA de la GK de rata (pControl: 1.217 ± 0.504 vs pGK: 4.874 ± 2.674 ; $n=4$). També vam mesurar la sobreexpressió a nivell de proteïna mitjançant la determinació de l'activitat GK. Els fetges dels ratolins injectats amb pGK presentaven un 20% més d'activitat GK que els dels controls (10.87 ± 1.518 vs 8.910 ± 2.588 mU/mg de proteïna; $n=4$; no significatiu per t-Student).

		pControl	pGK
<u>Paràmetres sèrics</u>	lactat (mM)	7.981 ± 1.616	7.36 ± 0.343
	AGL (mM)	0.979 ± 0.447	1.73 ± 0.345 $p=0.11$
	TAG (mg/dL)	81.63 ± 8.087	95.16 ± 10.46 $p=0.17$
	Colesterol (mg/dL)	129.00 ± 23.720	126.70 ± 9.651
	Urea (mg/dL)	32.00 ± 0.029	30.20 ± 1.993
	ALT (U/L)	9.00 ± 3.000	4.33 ± 1.202
	<u>Metabòlits hepàtics</u>	Glicogen (mg glc / g fetge)	75.37 ± 24.62
lactat (μmol / g fetge)		4.413 ± 1.059	3.470 ± 0.635
TAG (mg / g fetge)		14.60 ± 1.922	18.24 ± 2.475 $p=0.14$

Taula 14. Anàlisi metabòlic de ratolins ICR injectats amb pGK després de 18 dies de la injecció. Les dades representen la mitjana \pm error estàndard ($n=4$). S'indica el valor de p determinat per t-Student.

Malgrat no tenir una sobreexpressió clara de GK, vam mesurar alguns paràmetres sèrics i alguns metabòlits hepàtics, recollits a la taula 14. No vam detectar diferències significatives entre els dos grups experimentals, però sí una tendència del grup pGK a tenir més elevats els nivells de AGL i de TAG en sang, i a acumular TAG al fetge.

1.1 Estudi a llarg termini de la sobreexpressió de GK al fetge de ratolins sans

La sobreexpressió mantinguda de GK en el fetge ja ha estat avaluada prèviament en 3 models de ratolins transgènics.

1. Per una banda, Ferre *et al* [116, 117] van generar un ratolí transgènic que expressa el gen de la GK al fetge sota el control del promotor de *Pck1*. Malgrat tenir una etapa inicial de disminució de glicèmia i insulinenèmia, aquests ratolins acaben desenvolupant resistència a insulina amb un quadre de dislipidèmia i esteatosi hepàtica.
2. En contraposició, els ratolins transgènics amb l'expressió de GK dirigida pel promotor de l'apolipoproteïna A-I (apoA-I), descrits per Hariharan *et al* [118], mantenen una disminució tant de la glicèmia com de l'índex de massa corporal (IMC) al llarg de la seva vida.
3. Finalment, existeix el model de ratolí amb una còpia extra del gen de la GK que són resistents a desenvolupar diabetis de tipus 2 induïda per dieta (cal tenir en compte que aquests ratolins no només tenen incrementada l'activitat GK al fetge, sinó també a la cèl·lula beta pancreàtica i als altres teixits on la GK s'expressa) [132, 133, 269].

A l'hora de valorar l'heterogeneïtat de fenotip d'aquests tres models esmentats, cal considerar que diferents promotors dirigeixen l'expressió del transgen de GK. Per aquest motiu, tant el moment (dejuni-alimentació) com el lloc (zona periportal - zona perivenosa -tot l'acinus) d'expressió de GK pot canviar i, en conseqüència, produir efectes diferents sobre el metabolisme hepàtic. D'altra banda cal tenir en compte que els models transgènics *per se* poden presentar adaptacions metabòliques degudes a la presència del transgen durant el desenvolupament embrionari i el creixement de l'animal.

Vista la potencialitat del nostre model de transfecció hidrodinàmica, ens vam plantejar avaluar quines serien les conseqüències de sobreexpressar la GK exclusivament a la zona perivenosa del fetge durant un període llarg de temps, en la fase adulta de la vida de l'animal.

Per obtenir una expressió de GK a llarg termini, vam canviar els vectors d'expressió. Els vectors sintètics convencionals tenen diverses característiques que els fa atractius per a la distribució de gens, sobretot pel seu potencial d'ésser administrats repetidament. No obstant, el seu ús és limitat a causa de la seva baixa eficiència per transferir gens i per la curta durada d'expressió del transgen (com vam poder observar amb els vectors tipus pCAGGs). Aquesta pèrdua d'expressió *in vivo* és probablement deguda a la desaparició del vector i/o a la inactivació transcripcional del promotor plasmídic.

Cal considerar que els plasmidis contenen DNA bacterià el qual és ric en 2'-desoxiribo dinucleòtids (citidina-fosfat-guanosina) (CpG) no metilats; en contraposició, el DNA dels mamífers conté dinucleòtids CpG en molt poca freqüència i estan majoritàriament metilats. Els mecanismes de defensa cel·lular dels vertebrats es valen de la diferència de metilació dels CpG per detectar DNA exogen; concretament, el receptor *Toll-like 9* (TLR9) reconeix el DNA CpG i inicia una cascada de senyalització que condueix a la producció de citoquines com la interleuquina-6 (IL6) i la interleuquina-12 (IL12) [382, 383]. Aquesta activació del sistema immune es pot evitar mitjançant l'eliminació dels dinucleòtids CpG de la seqüència del plasmidi, aprofitant que el codi genètic és degenerat [384, 385]. Diversos estudis avalen aquesta estratègia de reducció de CpG per prolongar l'expressió gènica *in vivo* [386-390]. En conseqüència, per realitzar aquest estudi a llarg termini vam escollir els vectors comercials **pCpG** (Invivogen) els quals, a més d'estar mancats de CpG, tenen eliminats els llocs de metilació Dam (GATC) per evitar la metilació procariota (Figura 32).

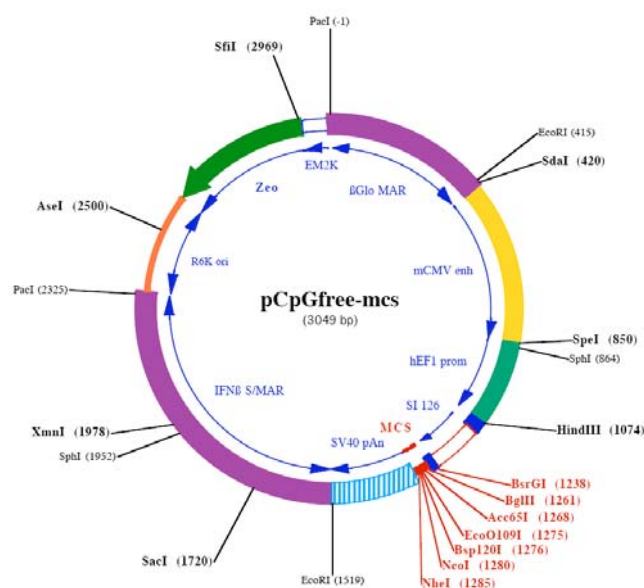


Figura 32. Esquelet dels vectors pCpG. Tot l'esquelet d'aquest plasmidi pCpG no conté cap dinucleòtid CpG. Conté elements per expressió en *E. coli*: 1. Origen de replicació R6K: és activat per la proteïna Π ,

codificada pel gen *pir*; 2. Promotor bacterià EM2K; 3. Marcador de selecció: gen de resistència a Zeocina™. També conté elements per expressió en cèl·lules de mamífer: 1. Promotor: combina el CMV *enhancer* de ratolí amb el promotor del factor d'elongació 1- α humà i conté un intró sintètic al 5'UTR; 2. Senyal de poliadenilació del SV40; 3. MAR (*matrix attached regions*), que són seqüències riques en AT i són capaces de formar barreres entre dominis independents. Els pCpG contenen 2 MAR, de la regió 5' del gen de la β -globina i del gen de l'interferó- β humans. Aquestes MARS serveixen per separar la unitat de transcripció bacteriana de la de mamífer.

Per altra banda, en aquesta part de l'estudi vam usar ratolins de la soca BALB/c per diverses raons: perquè presenta menys variabilitat poblacional que la soca ICR, perquè és de color blanc la qual cosa facilita la visualització de les venes a l'hora de la injecció hidrodinàmica i perquè ha estat utilitzada amb èxit en estudis de sobrexpressió amb vectors del tipus pCpG [386].

Obtenció del vector pCpG/GK i avaluació de la seva capacitat de transfecció *in vitro*

Mitjançant les tècniques de clonatge clàssiques de digestió amb enzims de restricció (concretament, *EcoO109I*) i de lligació, vam introduir el gen de la GK de rata al MCS (*multiple cloning site*) del vector comercial pCpG-mcs (*Invivogen*) per obtenir el plasmidi pCpG/GK.

Abans de començar els estudis *in vivo*, vam considerar convenient verificar *in vitro* que la construcció pCpG/GK podia expressar correctament la proteïna GK. Amb aquesta finalitat vam transfectar cèl·lules Huh7 amb pCpG/GK i, com a control negatiu i de transfecció, la construcció pCpG/GFP (*green fluorescent protein*) (Figura 33 A). Passades 48 hores de la transfecció, es va avaluar el contingut proteic de GK per *Western blot* (Figura 33 C) i també es va determinar l'activitat GK dels homogenats cel·lulars per assegurar-nos que la proteïna sobrexpressada era funcional (Figura 33 B).

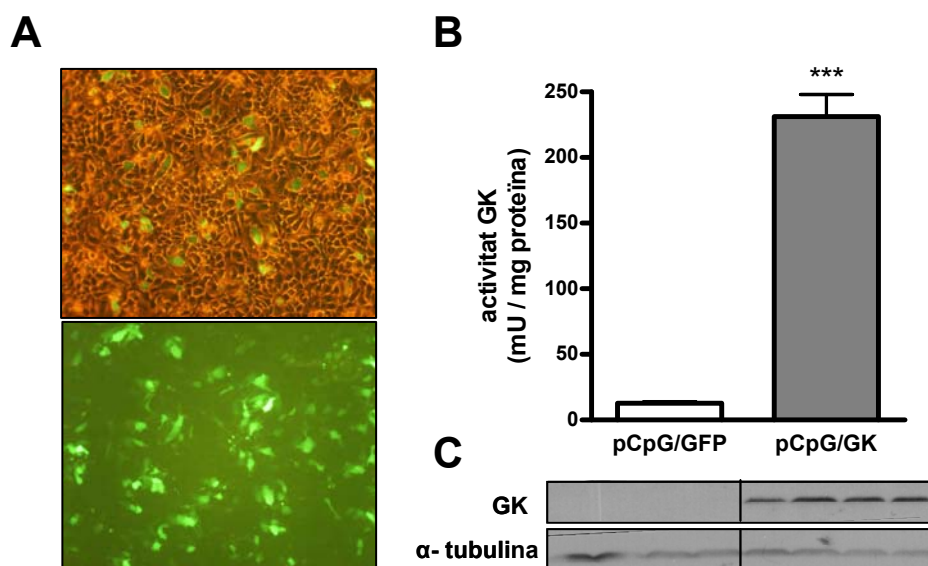


Figura 33. Sobrexpressió *in vitro* dels vectors pCpG/GFP i pCpG/GK. Cèl·lules Huh7 van ésser transfectades amb aquestes construccions mitjançant lipofectina. Passades 48 h, es van observar les

cèl·lules transfectades amb pCpG/GFP al microscopi de fluorescència per visualitzar l'eficiència de la transfecció i també de l'expressió de la GFP. (A). La sobreexpressió de GK es va confirmar per determinació de l'activitat enzimàtica dels homogenats cel·lulars (B) i per Western blot (C). *** $p < 0.001$ vs control determinat per t-Student.

Sobreexpressió de pCpG/GK en el fetge de ratolins sans

Un cop confirmada *in vitro* la capacitat d'expressió de la construcció pCpG/GK, vam injectar-ne 30 µg a ratolins BALB/c sans. Com a control, un grup de ratolins va rebre una injecció hidrodinàmica de solució salina Ringer-lactat. Es va fer un seguiment d'aquests animals durant 53 dies, que es detalla a la figura 34. Es van sacrificar en situació d'alimentació, perquè en els experiments preliminars es van veure diferències de glicèmia i insulinèmia entre els grups de ratolins alimentats (Taula 13)

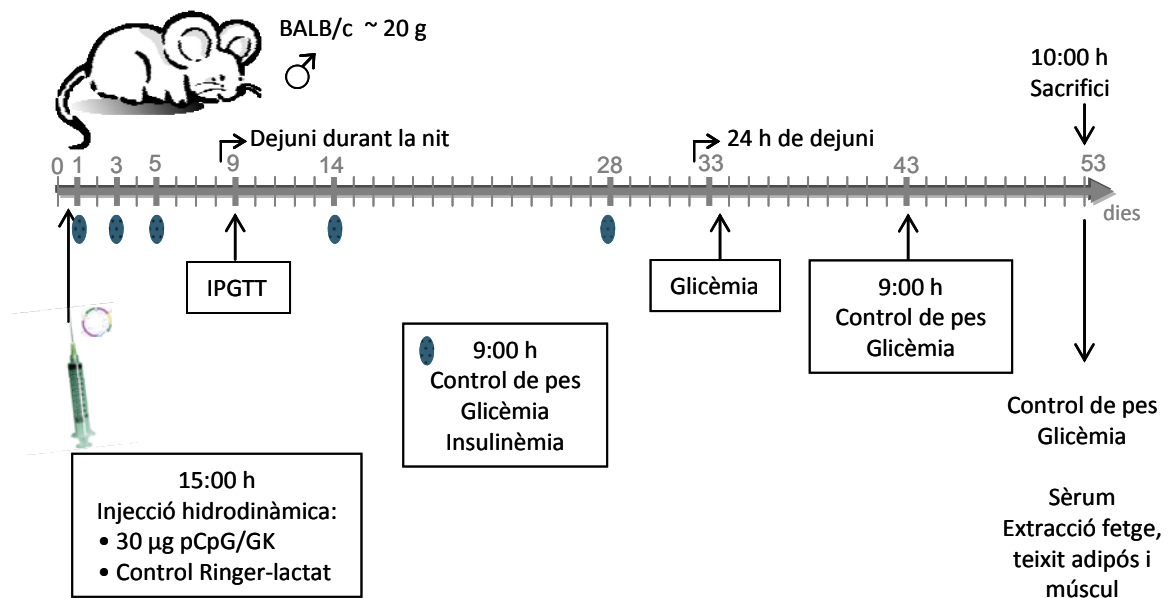


Figura 34: Protocol experimental de sobreexpressió a llarg termini de pCpG/GK en el fetge de ratolins sans.

Transcorreguts els 53 dies, és important destacar que no s'observà toxicitat hepàtica ja que els animals presentaven uns nivells baixos de transaminases en sèrum (nivells d'ALT de 27.44 ± 1.345 (U/L) pel grup control i 19.55 ± 1.956 (U/L) pel grup pCpG/GK; $n=5$ i 12 , respectivament). El que primer ens interessà avaluar fou el grau de sobreexpressió del transgen que presentaven els fetges dels ratolins transfectats amb pCpG/GK. Mitjançant qRT-PCR amb encebadors específics per al mRNA de la GK de rata, vam detectar que aquests ratolins encara mantenien un bon nivell d'expressió del transgen (Figura 35 A). A continuació vam estimar si aquest augment de mRNA de GK es corresponia amb un augment de proteïna (per *Western blot*) i d'activitat GK. Tal i com es mostra a la figura 35 B i C, només vam observar un increment del 17% (no significatiu) d'activitat GK i no es va poder notar cap variació en la quantitat total de

proteïna GK per *Western blot*. Cal tenir en compte que aquestes tècniques d'anàlisi a nivell de proteïna detecten tant la GK de rata com la GK endògena de ratolí.

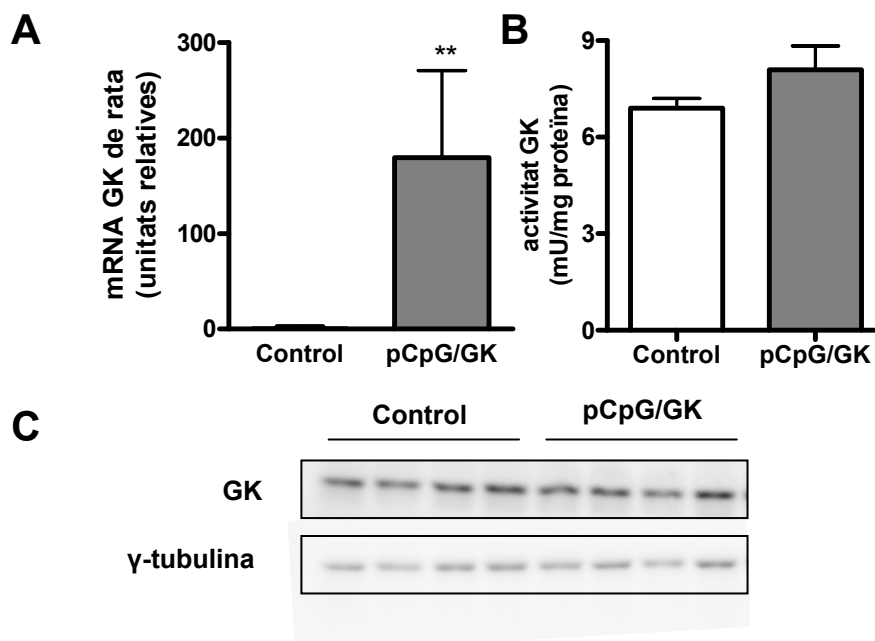


Figura 35: Sobreexpressió *in vivo* del vector pCpG/GK 53 dies post-injecció. Ratolins BALB/c van ésser injectats hidrodinàmicament amb 30 µg de pCpG/GK per animal. Després de 53 dies de la injecció, es va determinar el contingut del transgen en el fetge per qRT-PCR (A); l'activitat GK a una concentració de glucosa 100 mM (B); i la quantitat de proteïna GK per Western blot (C) on es mostren 4 animals representatius de cada grup. ** $p < 0.01$ vs control determinat per t-Student.

Malgrat que a temps final la sobreexpressió de GK a nivell de proteïna no era evident, durant el transcurs de l'experiment vam detectar variacions fenotípiques entre els animals transfectats amb pCpG/GK i els controls. Per aquest motiu, vam continuar l'anàlisi d'aquests ratolins ja que suposàvem que en les etapes inicials de l'experiment els nivells de proteïna GK sobreexpressada devien ser més alts i podien haver condicionat el metabolisme dels animals.

Centrant-nos en la progressió de l'experiment, no vam detectar diferències de pes entre els ratolins control i els injectats amb pCpG/GK (Figura 36 A). Pel què fa a la glicèmia, es pot observar que la sobreexpressió de pCpG/GK va provocar una disminució significativa de la glicèmia en els primers dies post-injecció però aquest efecte es va perdre ràpidament (Figura 36 B). La baixada de glicèmia inicial va anar acompanyada d'una baixada de la concentració d'insulina en sang (Figura 36 C), tal i com passa a la majoria d'estudis de sobreexpressió de GK. Ara bé, sorprenentment, els nivells d'insulinèmia van començar a pujar de forma significativa a partir del dia 15 post-injecció, en comparació amb els dels controls, i es van mantenir elevats fins a la fi de l'experiment (Figura 36 C i D).

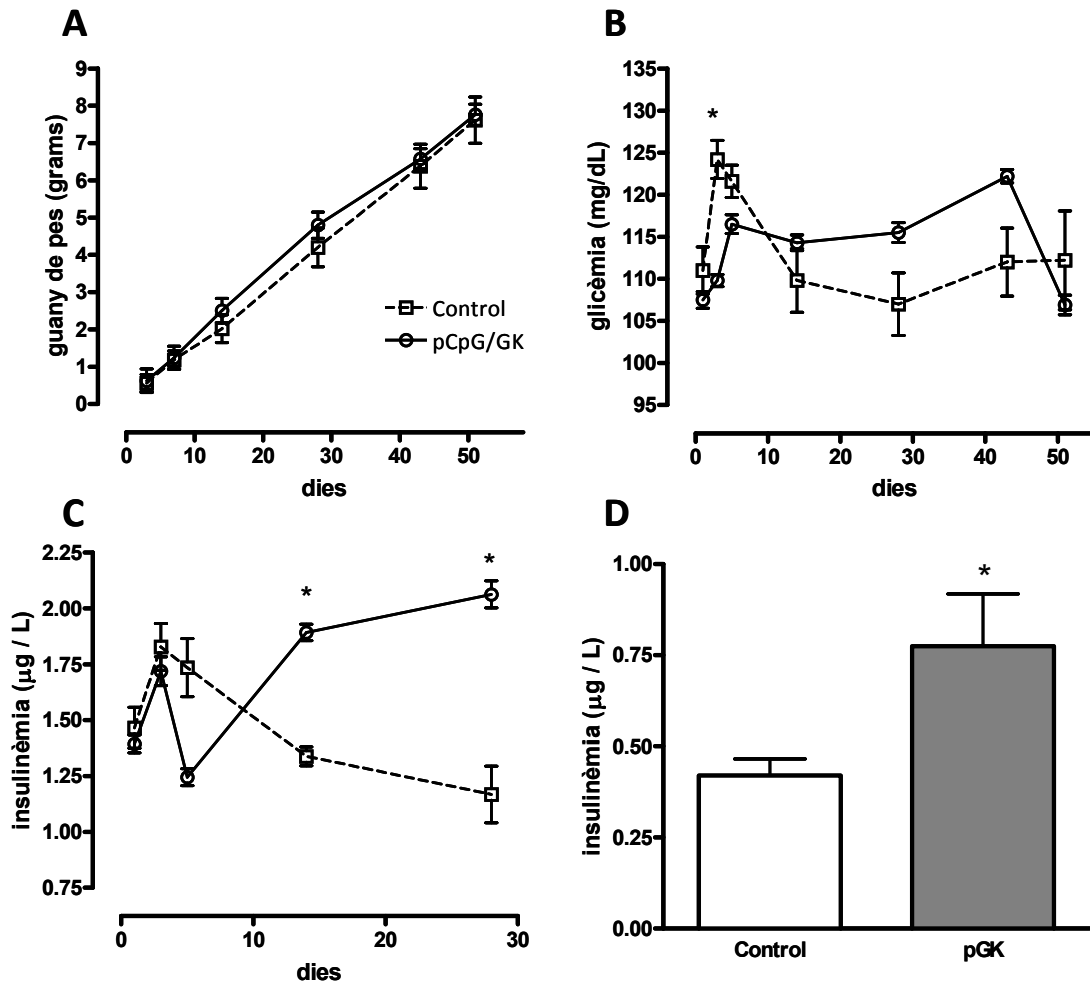


Figura 36. Evolució dels ratolins Balb/c injectats amb pCpG/GK durant 53 dies post-injecció. En els dies indicats, a les 10 del matí, es determinava el (A) pes dels animals, (B) la glicèmia; i (C) es recollia plasma per a mesurar-ne la insulinèmia. (D) Mostra la insulinèmia del dia 53, que va ésser determinada en mostres de sèrum. * $p < 0.05$ pCpG/GK versus Control, determinat per t-student ($n=5$ control i $n=12$ pCpG/GK).

En avaluar les glicèmies en dejuni, també vam observar diferències de resposta del grup pCpG/GK segons si estàvem a l'etapa inicial o final de l'experiment. A dia 9 post-injecció, en sotmetre els ratolins a un dejuni de 16 hores per tal de realitzar un test de tolerància a glucosa, vam detectar que la glicèmia a temps 0 dels ratolins pCpG/GK estava reduïda significativament respecte la glicèmia del grup control (Figura 37 A). No obstant, no es van veure canvis significatius entre els dos grups pel que fa a la resposta a la injecció intraperitoneal d'un bolus de glucosa (Figura 37 A). En canvi, a dia 43 post-injecció, la glicèmia dels ratolins després de 18 hores de dejuni no va variar entre els dos grups, i tampoc observàrem diferències en allargar el temps de dejuni a 24 hores (Figura 37 B).

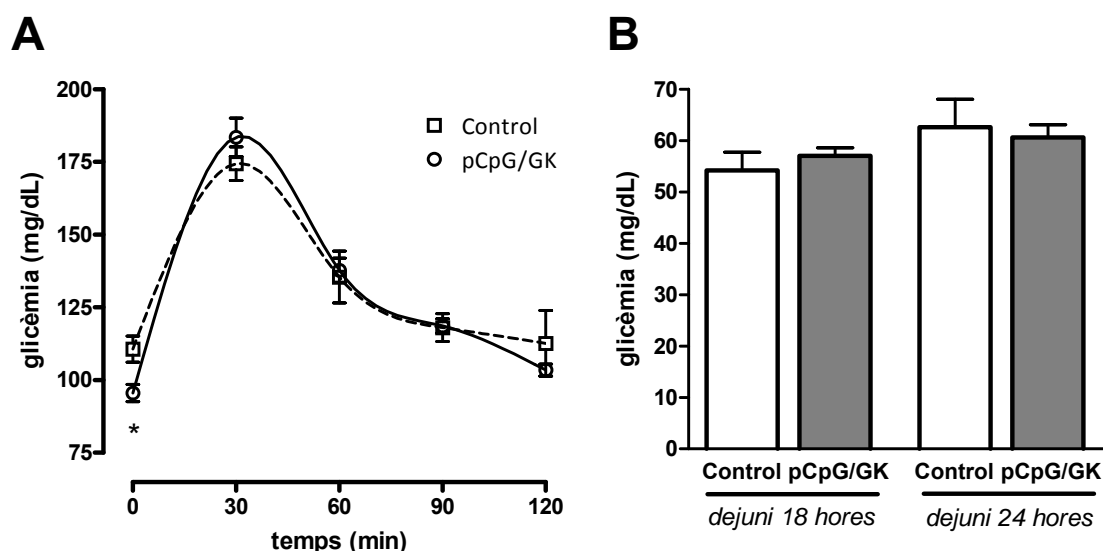


Figura 37. Avaluació dels efectes de la sobrexpressió de GK en un test de tolerància a glucosa i en un dejuni prolongat (A) Test de tolerància a glucosa dels ratolins injectats amb pCpG/GK a dia 9 post-injecció. Després d'un dejuni de 16 hores, es va injectar intraperitonealment un bolus de glucosa i es va mesurar la glicèmia cada 30 minuts. La gràfica mostra la mitjana \pm l'error estàndard de cada grup. **(B)** A dia 43 post-injecció, es va retirar el menjar de les gàbies dels ratolins i se'n va mesurar la glicèmia a les 18 i a les 24 hores de dejuni. Les barres representen la mitjana \pm l'error estàndard de cada grup. N= 5 i 12, respectivament. * $p < 0.05$, determinat per t-Student.

Avaluació de l'impacte de l'augment de GK sobre el metabolisme glucídic a llarg termini

Després d'observar que, a punt final, els ratolins transfectats amb pCpG/GK no presentaven diferències de glicèmia respecte als controls però sí un increment d'insulinèmia, vam aprofundir en l'anàlisi del perfil glucídic d'aquests animals per veure si hi havia alguna alteració en els efectes de la insulina en el fetge. Cal recordar que la insulina hi indueix la captació, metabolització i emmagatzematge de glucosa i per altra banda inhibeix la producció hepàtica de glucosa.

En primer lloc, els ratolins del grup pCpG/GK presentaven un increment significatiu del contingut de **lactat** en sèrum en comparació amb els controls (8.76 ± 1.161 vs 12.55 ± 0.617 mM; * $p < 0.05$, determinat per t-Student). Si l'augment del lactat sèric era degut a alteracions hepàtiques, podia ésser conseqüència de 2 esdeveniments en el fetge: augment de la glicòlisi anaeròbica i/o disminució de la gluconeogènesi (ja que el lactat és un precursor gluconeogènic). En conseqüència vam determinar el contingut de lactat hepàtic i vam analitzar els nivells d'expressió dels gens codificants per a enzims i factors de transcripció implicats en la glicòlisi i en la gluconeogènesi. Per una banda, vam observar que els ratolins del grup pCpG/GK presentaven una tendència a augmentar la transcripció d'enzims glicolítics (*Gck* endògena i *Pfkfb3*) i de factors de transcripció, com *Myc*, que activen la **glicòlisi** (Taula 15). No obstant, aquest increment que suposaria un major flux glucolític no es correspongué amb un augment

del contingut de lactat hepàtic ($4.158 \pm 0.622 \mu\text{mol} / \text{g}$ fetge pel grup control i 4.123 ± 0.311 pel grup pCpG/GK; n=5 i 12, respectivament). Cal afegir que tampoc no vam obtenir canvis en el contingut proteic de les isoformes de fetge de PFK-2 i de PK, enzims típicament glicolítics (Figura de 38). Resumint, no vam observar una inducció clara de la via glicolítica, però tampoc una inhibició.

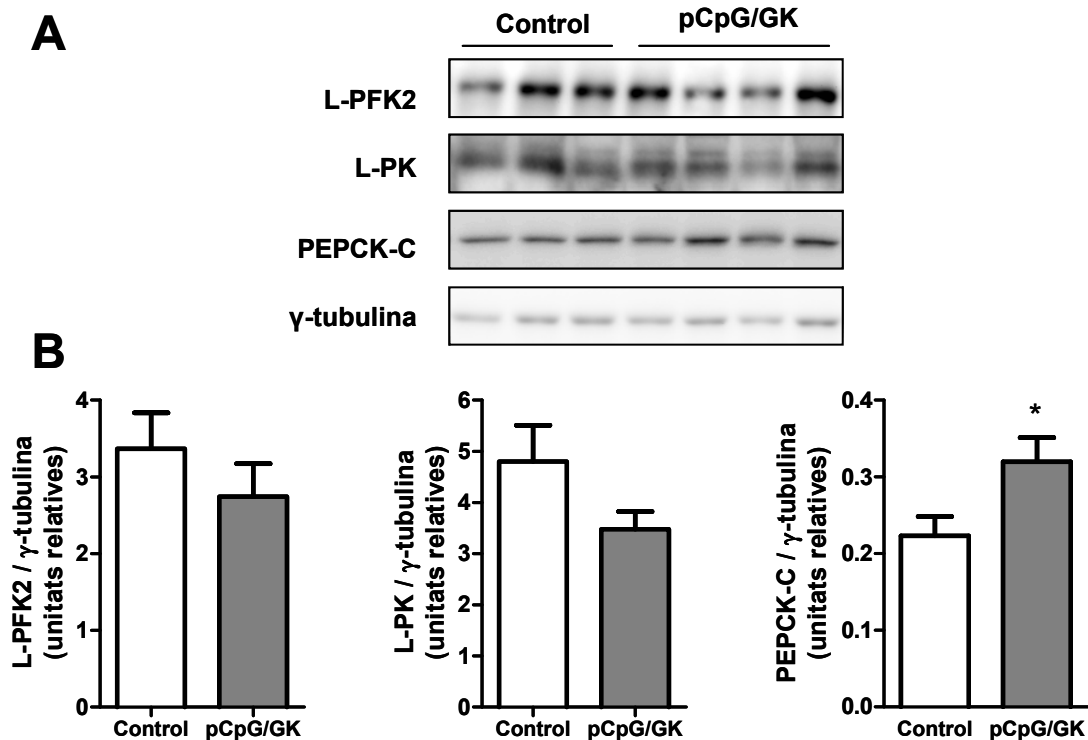


Figura 38. Anàlisi per *Western blot* del contingut d'enzims glicolítics i gluconeogènics en el fetge dels ratolins BALB/c transfectats amb pCpG/GK. (A) Després dels 53 dies d'experiment, es van obtenir els fetges dels ratolins i es van homogeneïtzar amb RIPA per determinar el contingut de proteïna per *Western blot*, com es mostra en aquesta imatge representativa. (B) Les gràfiques representen la quantificació densitomètrica del contingut proteic de L-PFK2, L-PK i PEPCK-C en els homogenats totals de fetge, corregida per γ -tubulina (serveix de control de càrrega del gel). * $p < 0.05$, test t-Student.

Pel què fa a la **gluconeogènesi** en els fetges dels animals pCpG/GK, no es va detectar cap variació en els nivells de mRNA de PEPCK (*Pck1*) - l'enzim limitant de la via gluconeogènica a partir de lactat -, tot i que en vam observar-ne un augment a nivell de proteïna (Taula 15 i Figura 38). Tampoc no hi van haver canvis en el mRNA de glucosa-6-fosfatasa (*G6pc*), que és l'últim enzim de la via gluconeogènica i glicogenolítica i, per tant, responsable de la regulació de l'alliberament de glucosa del fetge (Taula 15). Tant el gen de la glucosa-6-fosfatasa com el de PEPCK-C estan regulats a nivell transcripcional per factors de transcripció com HNF4- α (codificat per *Hnf4- α*), el mRNA del qual no varià, i PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated (PPAR)- γ coactivator-1 α* , codificat per *Ppargc1 α*), el mRNA del qual augmentà significativament en els animals del grup pCpG/GK (Taula 15). A la taula 15 veiem que també incrementà el

contingut de mRNA del transportador hepàtic de glucosa GLUT-2 (codificat per *Slc2a2*) i es va correspondre amb un augment del factor de transcripció HNF-3 γ (codificat per *Foxa3*), del qual s'ha demostrat que regula la transcripció de GLUT-2 [391]. En conjunt, es podria dir que els animals pCpG/GK presenten una activació de la via gluconeogènica en estat post-absortiu, en comparació amb els ratolins control.

		Control	pCpG/GK
Gen	Proteïna		
<i>Gck</i>	GK	1.021 \pm 0.107	1.272 \pm 0.113 *
<i>Pfkfb3</i>	PFK2	1.131 \pm 0.259	1.576 \pm 0.336
<i>Myc</i>	c-Myc	1.321 \pm 0.552	4.865 \pm 2.494
<i>Pck1</i>	PEPCK-C	1.134 \pm 0.276	1.120 \pm 0.068
<i>G6pc</i>	G6Pasa	1.041 \pm 0.151	1.124 \pm 0.209
<i>Slc2a2</i>	GLUT-2	1.002 \pm 0.030	1.310 \pm 0.067 **
<i>Hnf4</i>	HNF-4α	1.037 \pm 0.133	0.889 \pm 0.070
<i>Ppargc1a</i>	PGC-1α	1.021 \pm 0.102	1.373 \pm 0.089 *
<i>Foxa3</i>	HNF3-γ	1.061 \pm 0.175	2.025 \pm 0.295 *

Taula 15. Anàlisi per qRT-PCR dels nivells d'expressió d'enzims i de factors de transcripció importants en la glicòlisi i en la gluconeogènesi. Les dades es van analitzar fent el càlcul de $\Delta\Delta Ct$ utilitzant el gen de la $\beta 2$ -microglobulina com a normalitzador. Els valors representen la mitjana de cada grup relativa a la mitjana del grup control \pm l'error estàndard. N= 5 i 7, respectivament. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, test t-Student.

Per altra banda, vam analitzar la capacitat dels fetges dels ratolins pCpG/GK per emmagatzemar glucosa en forma de **glicogen**. La síntesi de glicogen és totalment depenent de l'activitat GK perquè permet l'obtenció de glucosa-6-fosfat, la qual és el substrat de la via i alhora és un activador al·lostèric de la glicogen sintasa. Sigui per l'increment de GLUT-2 o per altres motius, els fetges dels animals pCpG/GK presentaven uns nivells significativament més elevats de glucosa lliure que els animals control (Figura 39). Potser pel fet de tenir més glucosa lliure o més activitat GK que els controls, també presentaven una tendència a majors nivells de glucosa-6-fosfat (Figura 39). Sorprenentment, però, no vam detectar un augment de glicogen en el fetge d'aquests animals (Figura 39).

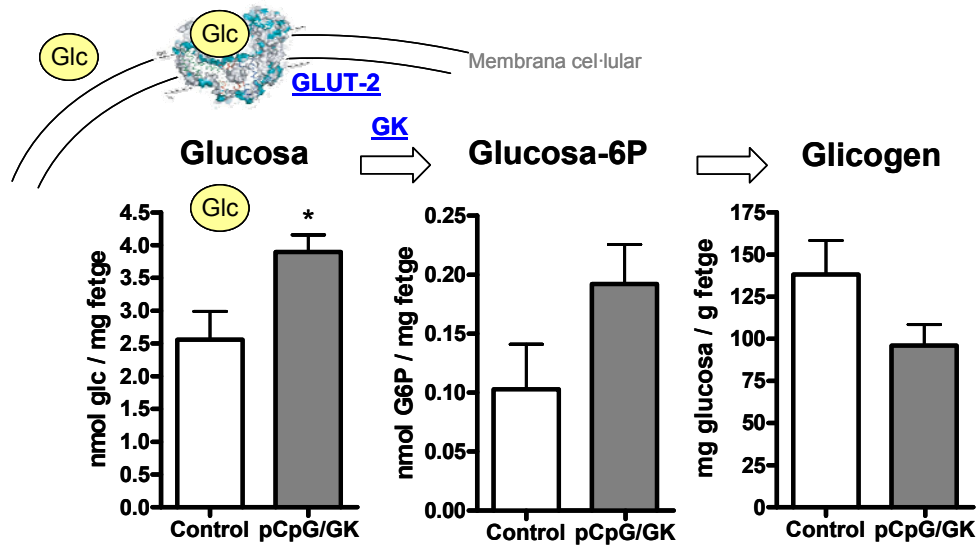


Figura 39. Determinació dels metabòlits hepàtics relacionats amb la síntesi de glicogen. 53 dies post-injecció, es van obtenir els fetges dels ratolins BALB/c injectats amb pCpG/GK i dels controls. Es van preparar els extractes pertinents (veure *Material i Mètodes*) per analitzar-ne el contingut de glucosa lliure, glucosa-6-fosfat i glicogen. Les gràfiques representen la mitjana \pm l'error estàndard; n=5 i 12, respectivament. * p<0.05, determinat per t-Student.

Avaluació de l'impacte de l'augment de GK sobre el metabolisme lipídic a llarg termini

Com que en estudis anteriors es lligava la sobreexpressió hepàtica de GK amb dislipidèmia [117, 270], es van analitzar els nivells de lípids sèrics dels ratolins pCpG/GK i dels controls. Contràriament al que està descrit, el grup pCpG/GK presentà una disminució significativa dels nivells d'àcids grassos lliures (AGL) i de triglicèrids (TAG) en sang (Figura 40). No s'observaren diferències significatives pel que fa al contingut de colesterol sanguini.

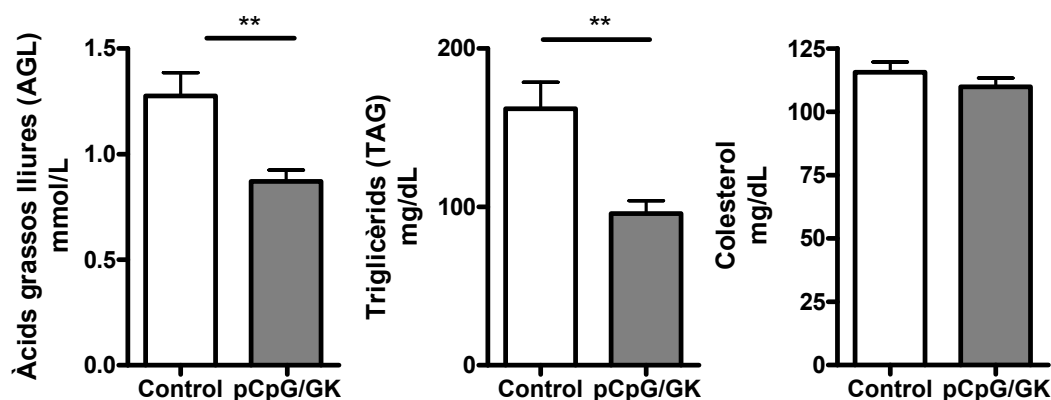


Figura 40. Perfil lipídic dels sèrums dels ratolins BALB/c després de 53 dies de sobreexpressió de GK al fetge. Els sèrums van ésser obtinguts en estat post-absortiu. Les dades representen les mitjanes \pm l'error estàndard. n= 5 i 12, respectivament. ** p<0.01, determinat per t-Student.

El descens dels AGL i TAG sèrics observat en el nostre model experimental podria ésser degut a alteracions del metabolisme lipídic hepàtic, com l'acumulació de lípids al fetge per activació de la lipogènesi i/o problemes de secreció de VLDL, o bé un increment de la β -oxidació mitocondrial d'àcids grassos i/o una disminució de la síntesi lipídica.

Primerament, vam analitzar el contingut lipídic del fetge per discriminar si hi havia esteatosi hepàtica. Els fetges dels ratolins pCpG/GK presentaven uns nivells de TAG (26.45 ± 0.90 mg/g de fetge) similars als dels animals control (26.84 ± 1.87 mg/g de fetge). El mateix va succeir en el cas del contingut hepàtic d'AGL (Control, 17.94 ± 2.99 mg/g de fetge; pCpG/GK, 18.60 ± 1.14 mg/g de fetge). Per tant, en els animals injectats amb pCpG/GK vam descartar que la disminució del contingut lipídic en sèrum fos deguda a l'acumulament de lípids al fetge.

Per avaluar les **vies lipogèniques**, vam determinar per qRT-PCR els nivells de mRNA d'enzims importants en la síntesi de lípids. Ni el gen *Fasn* (que codifica per a la proteïna FAS (*Fatty Acid Synthase*)) ni el gen *Mod1* (que codifica per a l'enzim màlic) presentaven diferències significatives entre els dos grups experimentals (Taula 16). Els factors de transcripció més importants en la regulació de la lipogènesi són ChREBP (*carbohydrate-responsive element-binding protein*), SREBP-1c i LXR α . Concretament, ChREBP s'activa pel metabolisme de glucosa i s'uneix a elements de resposta a hidrats de carboni (ChOREs) presents en gens lipogènics que responen a glucosa (ACC - acetil-CoA carboxilasa; FAS) i també en el gen glicolític L-PK. Els nivells de mRNA de ChREBP no van variar significativament en el grup experimental pCpG/GK en comparació amb el grup control (Taula 16). Per altra banda SREBP-1c està activat per la senyal d'insulina i indueix la transcripció de FAS, SCD-1 i GPAT. Sí que s'observà un augment significatiu en la transcripció de SREBP-1c (Taula 16). Tant SREBP-1c com ChREBP poden ésser activats transcripcionalment per LXR α - factor activat per oxisterols i important en la inducció de diversos gens lipogènics - ja que els seus promotors contenen elements de resposta a LXR (LXRE) [19, 392]. No obstant, existeix controvèrsia sobre si els LXRE de ChREBP són funcionals en el fetge i també sobre si els LXRs poden ésser activats directament per glucosa o no [158, 393]. En aquesta línia, vam observar que els ratolins pCpG/GK presentaven un augment dels nivells de mRNA de LXR α comparable a l'observat per SREBP-1c (Taula 16).

Un altre factor de transcripció involucrat en lipogènesi és PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ), un *knockout* hepàtic del qual ha demostrat que contribueix en la regulació de la transcripció de FAS, ACC i SCD1 implicats en esteatosi hepàtica, i també regula la captació de TAG sanguinis [394]. Els ratolins pCpG/GK presentaven una reducció significativa de PPAR- γ .

		Control	pCpG/GK
<u>Gen</u>	<u>Proteïna</u>		
<i>Fasn</i>	FAS	1.222± 0.457	1.167 ± 0.185
<i>Mod1</i>	Enzim màlic	1.024 ± 0.119	1.027 ± 0.128
<i>Nr1h3</i>	LXR-α	1.004 ± 0.047	1.593 ± 0.123 **
<i>Srebf1</i>	SREBP-1C	1.009 ± 0.068	1.599 ± 0.174 *
<i>Chrebp</i>	ChREBP	1.039 ± 0.146	0.803 ± 0.121
<i>Pparg</i>	PPAR-γ	1.018 ± 0.093	0.684 ± 0.069 *
<i>Cpt1a</i>	CPT-1α	1.013 ± 0.076	1.519 ± 0.092 **
<i>Hmgcs2</i>	HmgCoA sintasa	1.025 ± 0.106	0.823 ± 0.084

Taula 16. Gens implicats en la lipogènesi i en la utilització d'àcids grassos. Els valors representen la mitjana ± error estàndard de la relació relativa entre el grup tractat i el grup control. Els càlculs es van realitzar utilitzant l'algoritme del $\Delta\Delta Ct$ (Applied Biosystems) i utilitzant el gen de la-microglobulina com a normalitzador, * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$ vs control, determinat per t-Student, $n=5 - 7$.

A l'hora d'estudiar la **β -oxidació d'àcids grassos** al fetge, vam tenir en compte el factor de transcripció PGC-1 α , el qual és un co-activador que a més de regular gens gluconeogènics també està implicat en la regulació de l'oxidació d'àcids grassos i de la fosforilació oxidativa. A la Taula 15, ja hem esmentat que el tractament amb pCpG/GK induïa l'expressió de PGC-1 α . La β -oxidació s'inicia per l'acció seqüencial de dos enzims lligats a la membrana mitocondrial, Cpt1 i Cpt2, els quals són responsables de l'entrada d'acils-CoA al mitocondri. Els nivells de mRNA de Cpt1a dels ratolins injectats amb pCpG/GK eren significativament més alts que els dels controls (Taula 16). Aquestes dades suggereixen una inducció de la β -oxidació al fetge dels ratolins pCpG/GK.

Durant l'oxidació d'àcids grassos s'obté acetil-CoA dins del mitocondri a partir del qual es pot obtenir energia via cicle de Krebs o bé pot ésser convertit (només al fetge) en cossos cetònics. L'enzim regulador de la **via cetogènica** és la Hmg-CoA sintasa mitocondrial (codificada per *Hmgcs2*) del qual no s'observen canvis a nivell de mRNA entre el grup pCpG/GK i el grup control (Taula 16).

Després d'avaluar el metabolisme lipídic hepàtic, i per tal d'aprofundir en l'estudi de les diferències de lipidèmia observades entre els dos grups experimentals, vam analitzar el **teixit adipós** d'aquests animals. A nivell macroscòpic, no vam observar diferències òbvies de quantitat de teixit adipós entre els animals transfectats amb pCpG/GK i els controls. No obstant, vam detectar un increment del contingut de **TAG** per g de teixit en el grup pCpG/GK (1138 ± 50.98 , vs control: 797.6 ± 125.3 , $n=12$ i 5 , respectivament. ** $p < 0.01$, determinat per t-Student). Consistentment, vam observar per *Western blot* que els nivells de proteïna de PPAR-

γ i de PEPCK, ambdues implicades en la síntesi i re-esterificació de TAG al teixit adipós, estaven augmentats significativament en el grup tractat amb pCpG/GK (Figura 41).

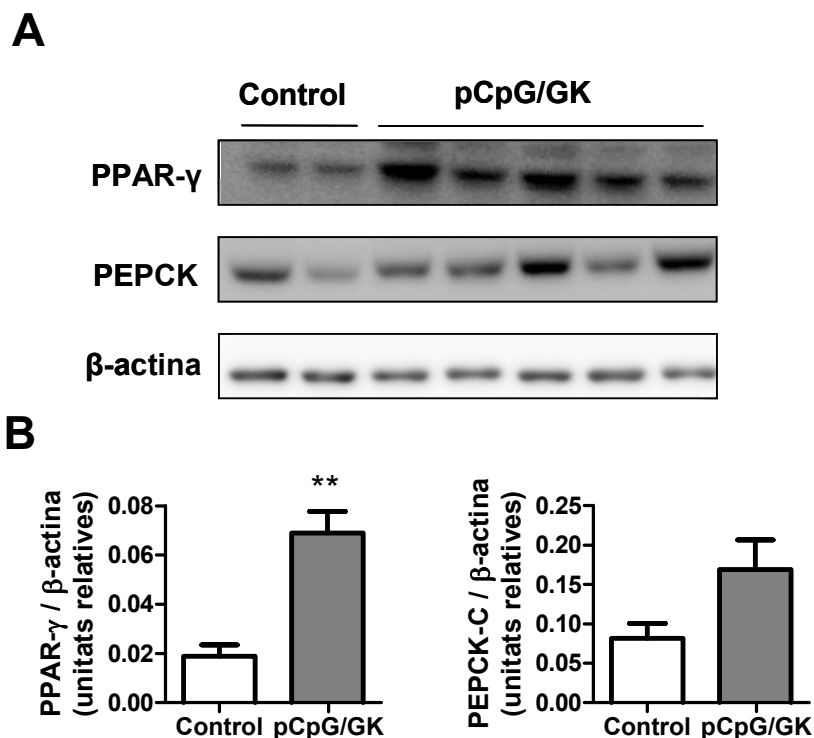


Figura 41. Anàlisi per Western blot del contingut de proteïnes implicades en lipogènesi i re-esterificació en el teixit adipós dels ratolins BALB/c transfectats amb pCpG/GK. (A) Després dels 53 dies d'experiment, es van obtenir mostres del teixit adipós epididimal dels ratolins i es van homogeneïtzar amb RIPA per determinar el contingut de proteïna per Western blot, com es mostra en aquesta imatge representativa. **(B)** Les gràfiques representen la quantificació densitomètrica del contingut proteic de PPAR-γ i PEPCK-C en els homogenats totals de teixit adipós, corregida per β-actina (serveix de control de càrrega del gel). ** $p < 0.01$, test t-Student.

En concordància amb l'augment d'adipositat que presentaven els animals que sobreexpressaven la GK al fetge, vam detectar una major producció de **leptina** al teixit adipós (92.53 ± 13.44 pg/mg teixit pel grup control i 166.3 ± 29.01 pel grup pCpG/GK; $n=5$ i 12 , respectivament. * $p < 0.05$, determinat per t-Student).

Anàlisi del metabolisme energètic i mitocondrial

D'entrada, havent observat una inducció de la β-oxidació en els fetges dels animals pCpG/GK ens vam interessar per avaluar si el seu estat metabòlic suposava algun avantatge energètic. Amb aquesta finalitat vam determinar els nivells d'AMP, ADP i ATP dels fetges dels animals controls i dels animals pCpG/GK i vam realitzar el càlcul de la càrrega energètica cel·lular. A la Taula 17 es mostra com el grup pCpG/GK presentava una càrrega energètica lleugerament menor que els controls ($p = 0.09$).

	Control	pGK
AMP ($\mu\text{mol} / \text{g}$ fetge)	0.784 \pm 0.063	0.980 \pm 0.130
ADP ($\mu\text{mol} / \text{g}$ fetge)	0.965 \pm 0.055	0.941 \pm 0.051
ATP ($\mu\text{mol} / \text{g}$ fetge)	1.033 \pm 0.134	0.757 \pm 0.172
càrrega energètica cel·lular	0.510 \pm 0.016	0.461 \pm 0.029 #

Taula 17: Contingut energètic dels fetges dels ratolins a 53 dies post-injecció. Els valors representen la mitjana \pm error estàndard, n=5 i 6, respectivament. # p= 0.09 Determinat per t-Student.

Malgrat haver-hi un increment de β -oxidació en el grup pCpG/GK no s'observà un increment d'ATP a la cèl·lula, tot el contrari. Una possible causa seria que la funció mitocondrial dels fetges d'aquests ratolins estigués alterada. Per avaluar-ho es va determinar l'estat mitocondrial a partir de biòpsies de fetge, mitjançant la tècnica de respirometria d'alta resolució, seguint el protocol i els càlculs detallats a l'apartat de *Material i mètodes* d'aquesta tesi. Destaquem que les dades s'han normalitzat per COX (valorada amb TMPD i ascorbat) que és indicativa del nombre de cadenes mitocondrials que funcionen en la mostra analitzada (Figura 42 B).

En avaluar la respiració a través del complex I de la cadena mitocondrial (mitjançant l'addició successiva de glutamat i malat, més ADP), s'observà que hi ha més consum d'oxigen en els fetges dels animals del grup pCpG/GK (Figura 42 B). Vam avaluar la respiració a través del complex II (en presència de succinat) i també vam observar diferències significatives entre els grups (Figura 42 C). En afegir antimicina-A, que atura la cadena respiratòria, el grup pCpG/GK presentava un consum d'oxigen elevat, que correspon a un consum d'oxigen extra-mitocondrial (peroxisomes, lisosomes, etc.) i a processos d'auto-oxidació (Figura 42 A).

Amb aquests resultats de respirometria, semblaria que les cadenes mitocondrials són perfectament funcionals en els fetges dels ratolins que sobreexpressen GK. A més, vist que hi ha un cert increment de β -oxidació, un increment de respiració al complex I al complex II, i que no hi ha un increment d'ATP, ens vam plantejar avaluar el **desacoblament** entre la cadena mitocondrial i l'ATP sintasa. Així doncs, vam determinar els nivells d'expressió del gen que codifica per la proteïna desacobladora 2 (Ucp-2) i no vam observar diferències entre els dos grups experimentals (Control, 1.04 \pm 0.16 unitats relatives, pCpG/GK, 1.05 \pm 0.10 unitats relatives; n= 5 i 7, respectivament).

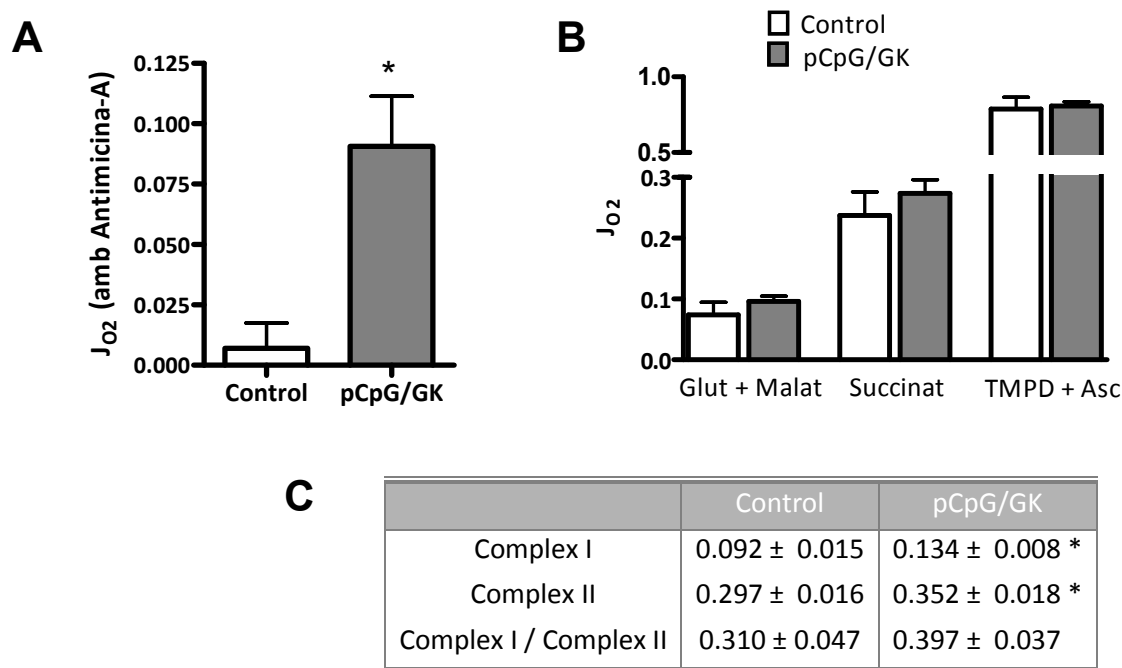


Figura 42. Avaluació de la funció mitocondrial dels fetges injectats amb pCpG/GK a llarg termini. A dia 53 post-injecció, es van obtenir biòpsies de fetge dels ratolins i van ésser analitzades en el respiròmetre d'alta resolució. **(A)** Es mostra el consum d'oxigen detectat en afegir antimicina-A (dades brutes). Les barres representen la mitjana ± l'error estàndard de les dades brutes. **(B)** Es mostra el consum d'oxigen net detectat segons l'addició de substrats indicats a la base de la barra (parlem de consum net perquè se li ha restat el consum d'oxigen obtingut en presència d'antimicina-A). **(C)** La taula conté els valors de mitjana ± l'error estàndard dels càlculs realitzats amb les dades de respirometria a les quals se'ls ha restat el consum d'oxigen amb Antimicina-A i s'han normalitzat per COX. * $p < 0.05$, determinat per t-Student. N= 4 i 12, respectivament.

Com que amb la respirometria no vam poder avaluar directament el "leakage" (pèrdua d'electrons de la cadena respiratòria), vam analitzar-lo de manera indirecta. Generalment les fugues d'electrons de la cadena respiratòria es correlacionen amb un augment de les espècies reactives d'oxigen (ROS) a la cèl·lula, augmentant l'estrès oxidatiu. La cèl·lula presenta mecanismes de defensa davant l'**estrès oxidatiu** com per exemple els enzims superòxid dismutasa (SOD), la glutatió peroxidasa o la catalasa. Reaccions no enzimàtiques com les catalitzades per les vitamines C i E, el glutatió reduït (GSH), la cisteïna o el coenzim Q també tenen un paper protector. Per avaluar la capacitat de protecció davant l'estrès oxidatiu dels hepatòcits dels ratolins que sobreexpressaven la GK a llarg termini, vam determinar els nivells de glutatió i també vam avaluar per *Western blot* la quantitat d'enzim superòxid dismutasa (SOD). La superòxid dismutasa (SOD), enzim que s'acumula en resposta a estrès oxidatiu, es mantenia a nivells estables pel què fa a la seva forma soluble (SOD-1), mentre que hi hagué una lleugera disminució dels nivells de la forma mitocondrial (SOD-2) en els fetges dels ratolins tractats amb pCpG/GK (Figura 43 A i B). Aquesta baixada seria coherent amb la pèrdua de

capacitat de resposta a ROS que s'observa en un estat prolongat i mantingut d'estrès oxidatiu. Per la seva banda, els nivells de glutatió reduït estaven disminuïts en el grup pCpG/GK (Figura 43 C), la qual cosa indica també una davallada de les capacitats antioxidants endògenes.

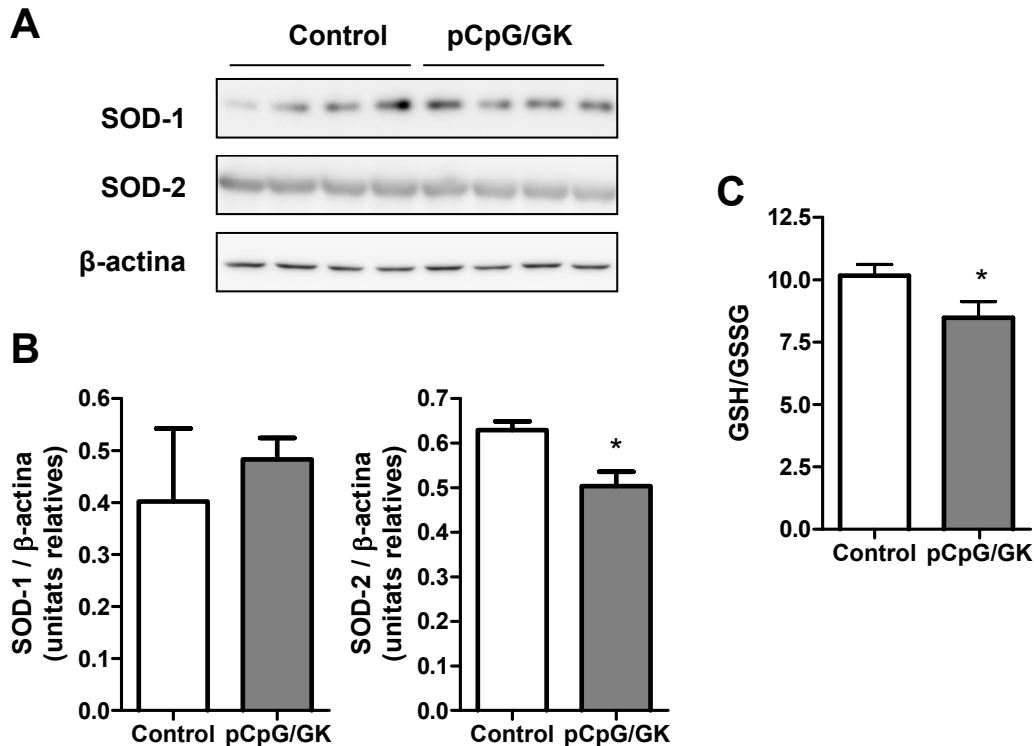


Figura 43. Avaluació d'estrès oxidatiu en els fetges dels ratolins injectats amb pCpG/GK a llarg termini. (A) El contingut cel·lular de la forma citosòlica (SOD-1) i mitocondrial (SOD-2) de la superòxid dismutasa va ésser determinat per *Western blot*. (B) Les dades representen la mitjana \pm error estàndard de l'anàlisi densitomètrica del *Western blot* (n=4). (C) També es van determinar els nivells de glutatió oxidat (GSSG) i reduït (GSH). El gràfic mostra la mitjana \pm error estàndard del quocient GSH/GSSG (n=5 i 12, respectivament). * $p < 0.05$ vs control, segons el test t-Student.

La sobreexpressió de GK a llarg termini genera resistència a insulina?

Després d'observar l'amibigüitat de la sobreexpressió hepàtica de GK pel què fa a la inducció de resistència a insulina a llarg termini que existeix a la bibliografia, vam plantejar-nos respondre aquesta pregunta en el nostre model. Tot i que per fer un bon anàlisi de la sensibilitat a insulina caldria fer un bolus d'insulina i agafar teixits després de 5 minuts, nosaltres vam avaluar-ho de manera indirecta en els òrgans clau per la resistència a insulina (fetge, teixit adipós i múscul).

Pel què fa al múscul esquelètic, la insulina promou la translocació del transportador de glucosa GLUT-4 a la membrana de manera que s'afavoreix la captació de glucosa sanguínia i la síntesi de glicogen. En conseqüència, en estat de resistència a insulina no s'acumula glicogen en el múscul. Per aquest motiu vam usar la determinació del contingut muscular de glicogen com a

indicador de resistència a insulina i vam observar que els ratolins que sobreexpressaven GK al fetge presentaven uns nivells de glicogen muscular lleugerament superiors als del control (Control: 13.00 ± 1.87 ; pCpG/GK 15.96 ± 1.13 mmols de glucosa / mg de múscul; n= 5 i 12, respectivament).

Al teixit adipós, la insulina també promou la translocació de GLUT-4 a la membrana i permet l'entrada de glucosa per a la síntesi de TAG. Per altra banda, la insulina inhibeix la lipòlisi. Així, quan hi ha resistència a insulina, existeixen elevats AGL en sang i baix contingut de TAG al teixit adipós. Ja vam observar en l'apartat de metabolisme lipídic d'aquest capítol que els animals injectats amb pCpG/GK presentaven uns nivells significativament menors de AGL en sang i, per altra banda, nivells elevats de TAG al teixit adipós. Per aquest motiu, podríem concloure que no existeix resistència a insulina en el teixit adipós. Per altra banda, vam poder analitzar per Western blot l'estat de fosforilació d'Akt, important en la senyalització d'insulina i no es van veure diferències significatives entre els dos grups experimentals (Figura 44).

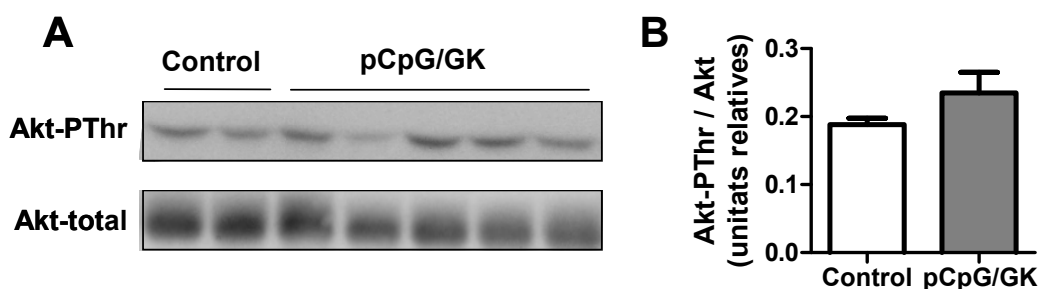


Figura 44. Avaluació per Western blot de la sensibilitat a insulina del teixit adipós de ratolins sans que sobreexpressen la GK al fetge durant 53 dies. El panell (A) mostra un Western representatiu dels nivells d'Akt-P-Thr i els nivells d'Akt-total. El gràfic (B) representa l'anàlisi densitomètrica del Western blot.

Finalment al fetge, la insulina promou la síntesi de glicogen i de TAG. En apartats anteriors ja vam detectar una disminució del contingut de glicogen hepàtic en els animals injectats amb pCpG/GK en comparació amb els controls. Tampoc no vam observar un increment de TAG hepàtics en aquest grup. Per últim, vam poder resoldre per Western blot una disminució dels nivells de fosforilació de la proteïna S6K en els homogenats hepàtics dels animals que sobreexpressen la GK. La proteïna S6K és fosforilada com a resultat de l'activació de la via de mTOR per insulina (Figura 45). L'escollírem com a marcador en lloc de la fosforilació d'AKT perquè la fosforilació d'AKT és difícil d'observar en un estat estacionari.

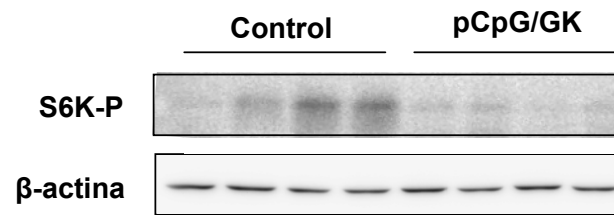


Figura 45. Avaluació de la sensibilitat a insulina dels fetges transfectats amb GK a llarg termini. La figura mostra un *Western blot* representatiu on s'avalua el nivell de fosforilació de S6K.

Fent una valoració conjunta de tots els resultats exposats en aquest apartat, podríem concloure que els ratolins injectats amb pCpG/GK i analitzats 53 dies post-injecció presentaven resistència a insulina només en el fetge.

DISCUSSIÓ

A l'hora de sobreexpressar proteïnes al fetge, com la GK, s'han buscat estratègies que proporcionin un alt grau de transfecció, del tipus transfecció adenovírica, o bé s'han produït animals transgènics que expressin el transgen sota el control d'un promotor hepàtic. Però en cap cas s'ha tingut en compte el concepte de zonació hepàtica, pel qual la GK es troba expressada fisiològicament i de manera majoritària a la zona perivenosa del fetge [46, 87]. A l'hora de buscar una estratègia tècnica per transfectar exclusivament els hepatòcits pericentrals, vam testar si la injecció hidrodinàmica era un mètode adequat mitjançant la transferència d'un plasmidi que codifica per la proteïna GFP a ratolins sans. L'observació de fluorescència verda en seccions de fetge d'aquests ratolins, conjuntament amb una tinció immunològica de PEPCK-C (proteïna periportal), ens va servir per demostrar que els grups d'hepatòcits transfectats que s'obtenen amb una injecció hidrodinàmica corresponen als hepatòcits circumdants a la vena central de l'acinus hepàtic. Durant el transcurs d'aquesta tesi, altres grups han corroborat aquesta observació [368, 371]. En conseqüència, la tècnica d'injecció hidrodinàmica fou l'escollida pels nostres estudis d'expressió de GK al fetge perivenós, encara que sigui una tècnica amb menor potència que els adenovirus i amb una eficiència de transfecció bastant variable, la qual cosa implica usar un major nombre d'animals. El gran avantatge de la injecció hidrodinàmica és que es treballa amb DNA nuu, el qual es pot obtenir de forma fàcil i econòmica.

Si es vol obtenir una expressió efectiva del transgen en el fetge, és important seleccionar el vector que dirigeixi la seva transcripció. En el nostre treball, vam emprar el vector pCAGGs [381] el qual és molt potent però no ens garanteix una expressió prolongada del transgen, malgrat que en alguns estudis ha permès expressar el transgen més enllà dels 30 dies post-injecció [395]. Potser el plasmidi pGK (pCAGGs/GK) adquireix alguna conformació diferent que en dificulta l'expressió o bé n'afavoreix el silenciament. Per aquest motiu, per realitzar estudis de sobreexpressió de GK a llarg termini vam canviar de plasmidi i vam usar un vector pCpG. Vam observar que la construcció pCpG/GK ens va permetre obtenir a dia 53 post-injecció uns nivells de mRNA de GK de rata comparables als obtinguts per la construcció pGK a 2 dies post-injecció.

Un dels avantatges d'avaluar un model hidrodinàmic a llarg termini és que s'ha perdut la toxicitat inicial que causa la transfecció hidrodinàmica. D'aquesta manera podríem evitar que la reacció inflamatòria resultant de la injecció hidrodinàmica ens emmascarés els efectes ocasionats per la sobreexpressió de GK. Malgrat tenir alts nivells de mRNA del transgen, a dia 53

post-injecció de pCpG/GK, els nivells de proteïna GK no eren gaire elevats. Potser es deu a què l'hepatòcit té sistemes de regulació post-traduccionals de la GK que n'afecten la biologia, com per exemple, que no hi hagi prou GGRP per garantir l'estabilitat de la proteïna sobreexpressada [186, 187].

Amb el plasmidi pGK, vam poder confirmar que la transferència hidrodinàmica de GK al fetge d'animals sans provocava una disminució de la glicèmia en estat d'alimentació, segurament, per una major captació hepàtica de glucosa. En conseqüència també s'observava una davallada dels nivells d'insulina en sang. Aquests resultats eren coherents amb els d'altres grups que prèviament havien realitzat estudis de sobreexpressió de GK al fetge d'animals sans usant o bé ratolins transgènics [116], o bé rates o ratolins injectats amb adenovirus [270, 271]. A l'hora d'estudiar si la sobreexpressió de GK té conseqüències en situació de dejuni, vam observar que la sobreexpressió a la zona perivenosa del fetge no tenia cap efecte sobre la glicèmia ni la insulinèmia, com també s'observà en els grups de O'Doherty *et al* i Desai *et al* en els seus treballs amb adenovirus [270, 272]. No obstant, a la bibliografia no existeix un acord sobre si la sobreexpressió de GK provoca una davallada de la glicèmia i la insulinèmia en estat de dejuni [118, 132, 272, 396]. Aquesta controvèrsia podria estar explicada per quatre motius:

- a) Els animals transgènics sobreexpressen la GK al llarg de la seva vida i possiblement presenten canvis compensatoris en la secreció d'insulina, en l'acció de la insulina o en altres variables metabòliques.
- b) L'administració d'adenovirus *per se* indueix alguns canvis metabòlics en el fetge infectat.
- c) Els promotors usats per dirigir la sobreexpressió de GK determinen quina població d'hepatòcits expressa el transgen i, segons quina sigui, podria tenir conseqüències metabòliques diferents; a més a més, el promotor també pot determinar el moment de l'expressió (dejuni, alimentació, sempre).
- d) Els nivells de sobreexpressió de GK també poden ésser importants per a determinar els efectes metabòlics.

En general, quan comparem els nostres resultats amb els descrits a la bibliografia sempre és difícil avaluar si les variacions són dosi-depenents o en funció de la localització de la GK. Seria interessant haver pogut realitzar en paral·lel una transfecció de GK a la zona periportal, empresa pràcticament impossible en el nostre model.

Vist que la injecció hidrodinàmica de pGK permetia obtenir uns efectes fenotípics clars sobre l'homeostasi de glucosa, vam procedir a analitzar les conseqüències d'una sobreexpressió de GK al fetge perivenós a llarg termini mitjançant l'ús dels vectors pCpG.

Ens interessava avaluar si el fenotip obtingut s'assemblaria a algun dels 3 models de transgènics que sobreexpressen GK al fetge que existeixen a la bibliografia [117, 118, 269], els quals difereixen sobretot pel què fa a l'aparició de resistència a insulina a llarg termini. A temps curts de l'experiment també vam reproduir el fenotip de disminució de la glicèmia i la insulinèmia en comparació amb els controls que havíem observat amb els pGK, però de seguida es va perdre aquest efecte. Aquesta pèrdua no anava lligada a una disminució de l'expressió del transgen, ja que a dia 53 post-injecció els nivells de sobreexpressió són significativament elevats. Per tant, la causa era algun altre fenomen. Per altra banda, també vam observar que a dia 9 post-injecció, en fer un dejuni obteníem una disminució significativa de la glicèmia en el grup pCpG/GK, cosa que no s'havia observat en el cas dels pGK. L'explicació d'aquesta diferència podria ésser que s'assolissin dosis diferents de transfecció en els dos experiments, o bé que hem usat soques de ratolins diferents i que potser responen de manera desigual a la sobreexpressió de GK. En canvi, a dia 43 post-injecció el dejuni no ocasionà diferències significatives de glicèmia entre els dos grups experimentals.

El fet que es perdés el fenotip hipoglucemiant juntament amb l'observació que la insulinèmia augmentà significativament al llarg de l'experiment en el grup injectat amb pCpG/GK, ens conduí a pensar que la sobreexpressió de GK a la zona perivenosa del fetge durant un temps prolongat podia provocar resistència a insulina. A temps final de l'experiment, estaríem en una situació en què l'augment d'insulinèmia encara permet que es mantinguin els nivells de glucosa en sang en un rang normal.

El fetge dels ratolins que sobreexpressen la GK als hepatòcits perivenosos esdevé resistent a insulina

El model clàssic d'un animal que presenta resistència hepàtica a insulina és el ratolí LIRKO, el qual conté una deleció del gen del receptor de la insulina exclusivament al fetge [296]. Diverses característiques metabòliques del ratolí LIRKO coincideixen amb el resultat que hem obtingut sobreexpressant la GK al fetge perivenós:

1. **Augment d'insulinèmia**, possiblement a causa d'una disminució del *clearance* d'insulina en el fetge com a conseqüència de la resistència a insulina.

2. **Davallada dels nivells sèrics de TAG i d'AGL, sense acumulació de TAG al fetge**. La principal explicació hepàtica d'aquests fets seria que hi hagués una disminució de la capacitat lipogènica ja que el fetge no respon a insulina i en conseqüència disminueix la formació i secreció de VLDL. La síntesi de TAG a partir de glucosa està regulada a través de dos senyals: per una

banda, la glucosa és capaç d'activar el factor de transcripció ChREBP (via metabolització de la glucosa a xilulosa-5P) el qual s'uneix a seqüències ChOREs presents en gens lipogènics que responen a glucosa (ACC i FAS) i també en el gen que codifica per a l'enzim glicolític L-PK [22, 23]. Per altra banda, la insulina és responsable de l'activació del factor de transcripció SREBP-1c, el qual s'uneix a seqüències SRE (*sterol response elements*) presents en els promotors de gens com FAS, SCD-1 i GPAT [14].

Recentment s'ha demostrat que els promotors dels gens que codifiquen per SREBP-1c i per ChREBP contenen elements de resposta a LXR (LXRE) [19, 392], als quals s'uniria el factor de transcripció LXR α . Malgrat que està provat que LXR α indueix la transcripció de SREBP-1c no està clar si respon a insulina. Per altra banda també existeix controvèrsia sobre si LXR α activa transcripcionalment ChREBP en resposta a glucosa [158, 393]. En avaluar els nivells de mRNA d'aquests factors de transcripció en el fetge dels ratolins injectats amb pCpG/GK vam observar que no hi havia alteració en els nivells de ChREBP, però sí un augment de la transcripció de SREBP-1c i de LXR α . Com que s'ha observat que existeixen ratolins amb resistència a insulina que encara presenten nivells alts de SREBP-1c [397], podríem explicar aquest increment de SREBP-1c per una via independent a l'activació per insulina i dependent de l'activació de LXR α , el mRNA del qual estava incrementat a nivells semblants als de SREBP-1c en el nostre model experimental. No obstant, no vam observar cap variació en els nivells de mRNA de gens diana de SREBP i ChREBP, com són *Fasn* (codifica per FAS) i *Mod1* (codifica per l'enzim màlic).

Però ChREBP, SREBP-1c i LXR α no són els únics factors implicats en el control de la lipogènesi, també hi participa PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ), el qual malgrat estar expressat a baixos nivells en el fetge, té la funció d'activar la transcripció de gens lipogènics (FAS, ACC, SCD1) i també regular la captació de TAG sanguinis ja que activa la transcripció del receptor hepàtic de LDL [394]. Els animals que sobreexpressen la GK al fetge perivenós presentaven una disminució dels nivells de mRNA de PPAR- γ . Si analitzem les dades en conjunt, i tenim en compte que el fetge d'aquests ratolins no presentaven variació pel què fa al contingut de TAG hepàtics, podem concloure que no hi ha inhibició de la lipogènesi hepàtica. Per tant, ha d'existir algun altre factor que justifiqui la davallada de TAG i AGL sèrics.

En cercar una causa extrahepàtica per explicar la baixa lipèmia dels ratolins pCpG/GK, ens vam centrar en el teixit adipós. Està descrit que els ratolins LIRKO mantenen la sensibilitat a insulina al teixit adipós, de manera que l'augment d'insulinèmia provocava una disminució de la lipòlisi i per tant un menor alliberament de lípids del teixit adipós i per altra banda, la insulina induïa la producció i acumulació de TAG als adipòcits. D'aquesta manera podien justificar els nivells baixos de TAG i AGL en sang. Consistentment, vam obtenir que els ratolins del grup injectat amb pCpG/GK mantenien la sensibilitat a insulina al teixit adipós i en resposta a la

hiperinsulinèmia també presentaven uns nivells elevats de TAG al teixit adipós i una inducció clara de proteïnes lipogèniques com PEPCCK-C (implicada en la gliceroneogènesi i re-esterificació de TAG al teixit adipós) [398, 399] i del factor de transcripció PPAR- γ . Un altre treball que apunta en aquesta direcció és el de Gavrilova *et al* [394], en el qual s'estudia un *knock-out* hepàtic de PPAR- γ i es descrivia que aquests animals no presentaven variacions en els nivells de TAG hepàtics, però sí que incrementaven els del teixit adipós i, a més, aquests ratolins també desenvolupaven resistència a insulina.

3. Disminució del contingut de glicogen hepàtic. En condicions normals, la insulina estimula l'acumulament de glicogen a través d'un increment coordinat de: 1) l'entrada de glucosa amb la posterior metabolització a glucosa-6P, ja que la insulina és necessària per a la transcripció de GK la qual permet obtenir glucosa-6P (substrat de la via) i 2) de la via de síntesi de glicogen, ja que la unió de la insulina promou la defosforilació de la glicogen sintasa (és activa quan està defosforilada) mitjançant la fosforilació inhibidora de cinases com PKA i GSK-3, i també promou l'activació de la proteïna fosfatasa 1 (PP1) que al seu torn inhibirà la glicogen fosforilasa [12, 13].

Els ratolins pCpG/GK, malgrat que tenien un lleuger increment d'activitat GK i de glucosa-6P en el fetge, presentaven uns nivells de glicogen lleugerament inferiors que els controls, però no significativament. A part que la possible resistència hepàtica a insulina dels animals pCpG/GK pugui jugar-hi algun paper, cal tenir en compte que existeixen estudis de sobreexpressió de GK en animals amb diabetis induïda per estreptozotocina que presenten un augment del contingut hepàtic de glucosa pel sol fet de tenir GK, és a dir, de manera totalment independent de la insulina [116, 355]. Una altra prova a favor de la necessitat d'activitat GK per a la síntesi de glicogen és el ratolí transgènic *knock-out* de GK el fetge del qual presenta una reducció del glicogen hepàtic [131]. Per aquest motiu està generalment acceptat que l'augment d'activitat GK al fetge provoca acumulació de glicogen.

Però, cal tenir en compte que existeixen diversos treballs en què la sobreexpressió de GK en animals sans alimentats no fa variar el contingut hepàtic de glicogen [269, 270]. Una explicació podria ésser que l'activació del metabolisme de glucosa mitjançant la sobreexpressió de GK provoca una inhibició de l'expressió d'enzims gluconeogènics l'activitat dels quals és necessària per a la síntesi de glicogen per la via indirecta [35]. Per tant, existiria un balanç entre l'augment de síntesi directa de glicogen vinculada a l'activitat GK i la disminució de la síntesi per la via indirecta. D'altra banda cal considerar que la sobreexpressió de GK al fetge a curt termini disminueix la insulinèmia, la qual cosa podria tenir alguna implicació també en la síntesi de glicogen. Estudis de traçat metabòlic en humans han demostrat que ni la hiperglicèmia ni la

hiperinsulinèmia per si soles eren suficients per promoure la síntesi de glicogen; només quan es combinava la presència del substrat (glucosa) i el senyal hormonal s'assolia la síntesi de glicogen neta [400, 401].

Una altra explicació plausible seria que el grau de sobreexpressió de GK assolit en el nostre estudi no és suficient per incrementar el contingut de glicogen perquè Morral *et al* [355] van demostrar que la relació entre sobreexpressió de GK i acumulació de glicogen és dosi-dependent: a més transgen, més glicogen.

4. Manca d'inhibició de la gluconeogènesi hepàtica. Una de les principals accions de la insulina és inhibir la producció hepàtica de glucosa, tant per: 1) una acció directa al fetge a través de FOXO 1 i la inhibició de factors de transcripció com HNF-4 i PGC-1 α , els quals activen l'expressió dels gens que codifiquen per als enzims gluconeogènics PEPCK-C i glucosa-6-fosfatasa; 2) com per els efectes indirectes sobre la disponibilitat de substrats gluconeogènics. Els ratolins injectats amb pCpG/GK, malgrat la hiperinsulinèmia i l'hipotètic senyal de glucosa generat per la sobreexpressió de GK [35, 402], presenten una lleugera inducció de la gluconeogènesi hepàtica en situació d'alimentació (nivells incrementats de proteïna PEPCK-C i també increment de GLUT-2). Està descrit que el GLUT-2 incrementa en diabetis i es relaciona amb l'augment de la gluconeogènesi [116]. En concondrància, els nivells de *Foxa3* (codifica per HNF-3 γ) també estan elevats, ja que està demostrat per un model animal *knock-out* de HNF-3 γ que l'expressió de GLUT-2 ve regulada per aquest factor de transcripció [391]. Per altra banda, existeix un altre model *knock-out* de *Foxa3* el qual implica que pot regular directa o indirectament els nivells d'enzims gluconeogènics com PEPCK-C, però no afecta la glucosa-6 fosfatasa [403]. Paral·lelament, PEPCK-C també és regulada a nivell transcripcional per PGC-1 α , el mRNA del qual està incrementat en els ratolins pCpG/GK.

PGC-1 α és un factor de transcripció que regula conjuntament la via gluconeogènica i la de β -oxidació mitocondrial [404]. Si hi ha un increment de gluconeogènesi, la qual consumeix energia, és coherent tenir un increment de la β -oxidació mitocondrial la qual permet obtenir ATP i, a més a més, una taxa ràpida d'oxidació bloqueja la PDH, dirigint tot el piruvat cap a la gluconeogènesi per la piruvat carboxilasa. A més de l'augment de PGC-1 α , vam determinar que hi havia inducció de la β -oxidació mitocondrial en els fetges dels ratolins pCpG/GK perquè presentaven uns nivells incrementats de Cpt-1 (determinat per qRT-PCR). i una major respiració mitocondrial (determinada per respirometria d'alta resolució). L'augment de β -oxidació també és un argument per explicar la disminució del contingut sèric de AGL i TAG i la manca d'acumulació de TAG hepàtics que presenten els ratolins d'aquest grup. No obstant, no quedaria clara la procedència dels àcids grassos que s'oxiden.

5. **Manca d'activació de gens glicolítics.** Diversos gens glicolítics estan activats transcripcionalment en resposta a insulina (GK, PFK i L-PK), però alguns d'ells, per altra banda, també responen al senyal de glucosa (L-PK). Per aquest motiu sorprèn que el fetge dels ratolins que sobreexpressen al GK a la zona perivenosa del fetge no tinguin una inducció clara de la glicòlisi. Es fa palès també pel fet que no augmenten els nivells de lactat del fetge.

Tant la manca d'activació glicolítica com la manca d'inhibició de la gluconeogènesi al fetge no permeten explicar l'augment de lactat sèric que presenten els ratolins del grup pCpG/GK. Per tant, l'augment de lactat sèric s'hauria d'explicar per fenòmens extrahepàtics, com per exemple un increment de la utilització de glucosa al múscul esquelètic. El múscul respon a la insulina incrementant les taxes glicolítica i de síntesi de glicogen. Com que els músculs dels ratolins pCpG/GK presenten uns majors nivells de glicogen podríem extrapolar que també tenen incrementada la glicòlisi i la conseqüent formació de lactat com a conseqüència de la hiperinsulinèmia.

Estrès oxidatiu i resistència a insulina

Una de les possibles causes de la resistència a insulina dels ratolins que sobreexpressen la GK al fetge perivenós podria ésser l'estrès oxidatiu. L'estrès oxidatiu és el resultat d'un desequilibri entre les defenses antioxidants i la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS), com superòxid ($O_2^{\cdot-}$) i el peròxid d'hidrogen (H_2O_2). Com que tant el $O_2^{\cdot-}$ com el H_2O_2 són productes habituals del metabolisme cel·lular oxidatiu [405], un augment del metabolisme de glucosa a conseqüència de la sobreexpressió permanent de GK podria produir una quantitat excessiva de ROS. Si les defenses antioxidants estan baixes, com és el cas dels baixos nivells de GSH/GSSG i SOD-2 en els fetges dels ratolins injectats amb pCpG/GK, pot haver-hi acumulació de ROS. Aquesta acumulació pot afectar la supervivència cel·lular a través de l'oxidació directa de macromolècules com el DNA i lípids [[406, 407], i l'activació de senyals d'estrès cel·lulars [408]. En suport a aquesta hipòtesi, existeix un treball de sobreexpressió de GK a la cèl·lula β pancreàtica en què demostren que l'excés de metabolització de glucosa provoca estrès oxidatiu [409].

Per altra banda, s'ha demostrat que els ROS activen múltiples cascades de serines cinases. La via de senyalització d'insulina ofereix un bon nombre de dianes potencials d'aquestes serines cinases, com per exemple el receptor d'insulina i la família de substrats del receptor d'insulina (IRS). En el cas dels IRS-1 i IRS-2, un augment en la fosforilació de serines fa disminuir el grau de fosforilació en residus tirosina d'aquestes proteïnes i és consistent amb l'atenuació de

l'acció de la insulina [410, 411]. Hagués estat interessant confirmar-ho en els fetges dels ratolins injectats amb pCpG/GK mirant la via de NFκB.

Conclusió

En comparar el nostre model de sobreexpressió a llarg termini amb els que existeixen a la bibliografia, en termes de resistència a insulina s'assembla més al treball de Ferre *et al* [117], en el qual s'estudiava un model de ratolí transgènic que sobreexpressa la GK sota el control del promotor de la PEPCK-C (promotor periportal i que s'activa en situacions de dejuni). Però el fenotip de resistència d'un i altre són totalment diferents: mentre que els ratolins que sobreexpressen la GK a la zona perivenosa presenten resistència exclusivament hepàtica a la insulina, els ratolins que sobreexpressen la GK a la zona periportal presenten una resistència general a la insulina lligada a obesitat i a esteatosi hepàtica. Cal tenir en compte que els transgènics s'han estudiat després de 12 mesos de sobreexpressió. Potser, si poguéssim prolongar el nostre estudi fins a 12 mesos, acabaríem obtenint el mateix resultat. O potser, seria més similar al dels ratolins LIRKO, dels quals s'ha descrit que el seu fetge resistent a insulina esdevé displàsic amb l'edat i n'incrementa el contingut lipídic i el contingut biliar.

2. SOBREPRESSIÓ DE GK AL FETGE PERIVENÓS DE RATOLINS AMB DIABETIS DE TIPUS 1

Una possible estratègia terapèutica per a la diabetis tipus 1 és l'activació del metabolisme i l'emmagatzemament de glucosa en el fetge mitjançant la sobreexpressió hepàtica de GK. Aquesta aproximació ha estat estudiada per diversos grups amb el resultat que s'ha aconseguit reduir la hiperglicèmia diabètica (principal causant dels efectes perjudicials de la malaltia); però tot sembla indicar que la sobreexpressió de GK al fetge desencadena alteracions del metabolisme lipídic (com la inducció d'esteatosi hepàtica) que anul·larien les capacitats terapèutiques d'aquesta estratègia [116, 354, 355]. De nou, vam plantejar-nos avaluar si la sobreexpressió de GK específicament al fetge perivenós tindria els mateixos efectes sobre la glicèmia i el metabolisme lipídic obtinguts amb l'expressió periportal [116] o bé general [354, 355] de la GK al fetge.

Per dur a terme aquests estudis vam emprar un model de ratolins amb diabetis tipus 1 induïda experimentalment amb estreptozotocina (STZ; [2-deoxi-2(3-metil-nitrosurea)-1-D-glucopiranos]). La STZ és un antibiòtic d'ampli espectre produït per *Streptomyces achromogenes*. El seu efecte diabetogènic va ésser detectat pels laboratoris Upjohn (que actualment forma part de Pfizer) i es va poder establir que la STZ exerceix un potent efecte tòxic exclusivament a la cèl·lula beta pancreàtica, a la qual entra a través del transportador de glucosa GLUT-2 gràcies a la seva similitud estructural amb la glucosa (Figura 46). S'han proposat diferents mecanismes de toxicitat de la STZ a la cèl·lula beta: 1) metilació del DNA, 2) generació de radicals lliures i 3) producció d'òxid nítric, que desemboquen en mort cel·lular per apoptosi [412].

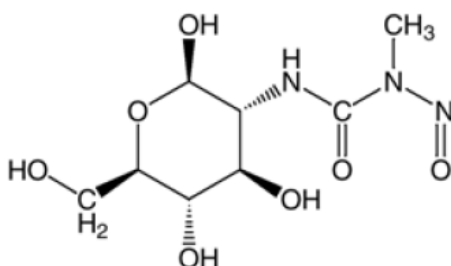


Figura 46. Estructura química de l'estreptozotocina (STZ).

A conseqüència de la destrucció de les cèl·lules beta pancreàtiques, aquest model es caracteritza per una disminució, gairebé total, dels nivells d'insulina, una hiperglicèmia severa i alteracions de la transducció de senyals dependents d'insulina.

El protocol d'administració de la STZ juga també un paper important sobre el mecanisme d'inducció de la diabetis:

- Una única administració intraperitoneal de STZ a dosis elevades (>160 mg/Kg) resulta en una destrucció ràpida de les cèl·lules beta per l'acció citotòxica de la STZ, amb una pèrdua de més del 90% de la secreció d'insulina, que desemboca en l'aparició d'hiperglicèmia en un període curt de temps (>7 dies).
- Quan la STZ s'administra en múltiples injeccions intraperitoneals a dosis baixes (≤ 50 mg/Kg) la seva acció citotòxica és menor, però s'indueix una resposta inflamatòria contra les cèl·lules beta, que cursa amb una infiltració limfocitària (insulinitis) que les destrueix, desembocant en una diabetis severa en un període més llarg de temps (diverses setmanes, depenent de la soca emprada).

En el present treball es va aplicar el protocol d'administració única de dosis elevades de STZ, tal i com es descriu a l'apartat de *Materials i Mètodes*. Una setmana post-injecció, molts animals presentaven una glicèmia superior a 350 mg/dl després de 8 hores de dejú i pesaven entre 18 i 23 grams. Però, vam esperar una setmana més a realitzar els experiments per assegurar que s'hagués perdut totalment l'expressió de la GK endògena a causa de la manca d'insulina. Es van descartar els animals de pesos inferiors a 18 grams per evitar possibles interferències degudes a una possible caquèxia induïda per l'absència d'insulina.

Sobrexpressió de pGK al fetge de ratolins amb diabetis tipus 1 induïda per STZ.

Un cop seleccionats els animals que presentaven un quadre clar de diabetis tipus 1, es van injectar amb 60 μ g de plasmidi pGK o bé amb 60 μ g de pControl (pCAGGs buit). A les 48 hores post-injecció, els animals van ésser analitzats i sacrificats. Un grup d'animals va ésser analitzat en estat d'alimentació i un altre, després de 5-6 hores de dejuni (Figura 47).

En realitzar l'anàlisi 48 hores post-injecció, alguns animals presentaven nivells molt elevats de transaminases com a conseqüència de la injecció hidrodinàmica i van ésser exclosos de l'estudi, per tal d'eliminar interferències de lesió hepàtica sobre els efectes del transgen. D'aquesta manera, els animals analitzats presentaven uns nivells de transaminases de l'ordre de 207.5 ± 29.88 U/L en el grup control i de 121.0 ± 48.43 U/L en el grup pGK, que es corresponen amb els nivells normals a 48 hores post-injecció hidrodinàmica .

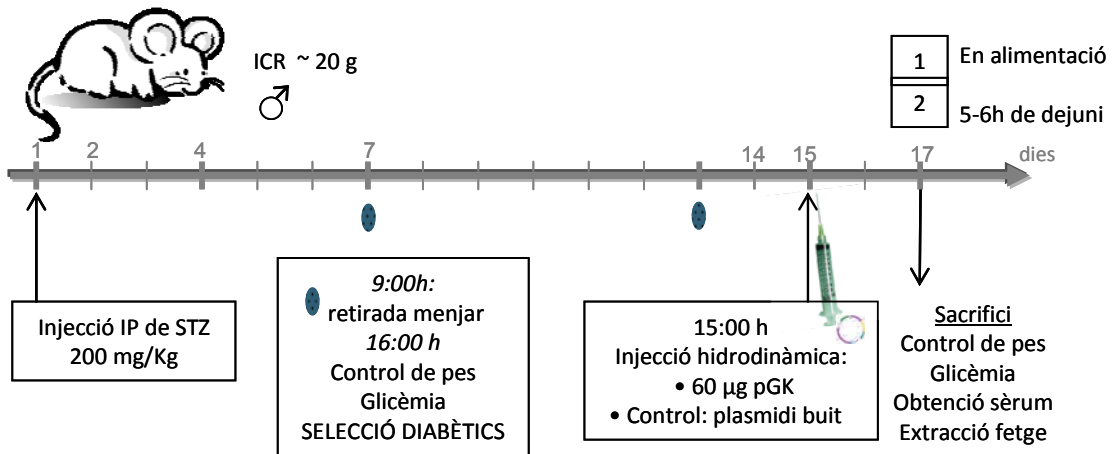


Figura 47. Procolol experimental de sobreexpressió de pGK en el fetge de ratolins amb diabetis tipus 1 induïda experimentalment amb STZ.

A punt final (48 hores), vam detectar l'expressió de la GK exògena per qRT-PCR (Figura 48). Tal i com es pot observar a la figura 48 A, la injecció hidrodinàmica confereix gran variabilitat en el nivell d'expressió del transgen.

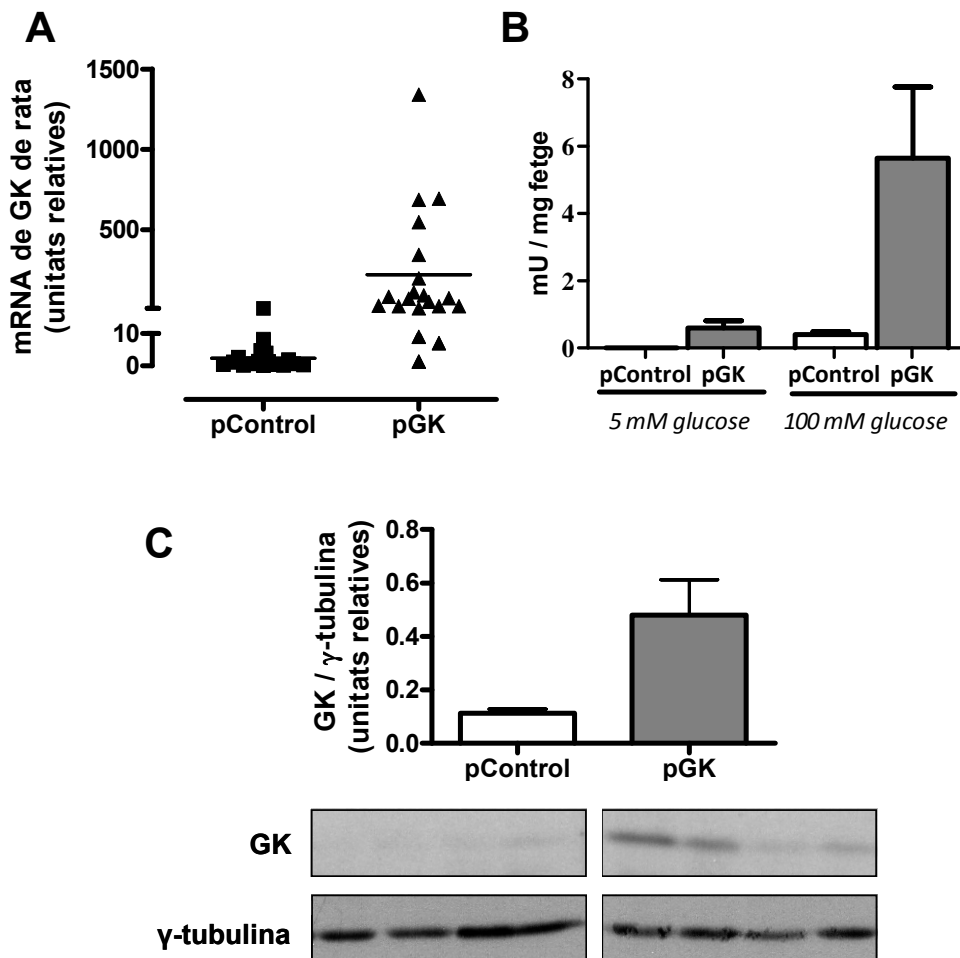


Figura 48. Avaluació del nivell de sobreexpressió de pGK en el fetge de ratolins amb diabetis tipus 1 induïda amb STZ. A les 48 hores post-injecció, els ratolins van ésser sacrificats i es va analitzar el nivell d'expressió del transgen al fetge per qRT-PCR, amb encebadors específics pel mRNA de la GK de rata. Els

resultats van ésser normalitzats amb β 2-microglobulina i expressats en relació al grup control (A). També es van obtenir extractes de fetge i se'n va determinar l'activitat GK a 5 mM i a 100 mM de glucosa (B) i també es van resoldre els homogenats de fetge per *Western blot* (C) on el panell inferior mostra un Western representatiu i el panell superior, l'anàlisi densitomètrica del Western blot.

Com que preteníem estudiar uns efectes terapèutics de sobreexpressió, es van seleccionar per a l'estudi només aquells animals que presentaven uns nivells d'expressió del transgen de l'ordre de 20 vegades l'expressió del grup control. Per confirmar l'expressió a nivell de proteïna, es van obtenir homogenats de fetge els quals van ésser analitzats per *Western blot* (Figura 48 C) i també se'n va determinar l'activitat GK (Figura 48 B). Els fetges dels animals control presentaven nivells pràcticament indetectables d'activitat GK, independentment de la dosi de glucosa assajada, tal i com s'espera d'un animal amb diabetis de tipus 1.

Impacte de la sobreexpressió de pGK en el fetge perivenós d'animals diabètics alimentats.

El que primer interessava avaluar era si la transfecció hidrodinàmica de pGK a la zona perivenosa del fetge podria tenir efectes sobre la glicèmia de ratolins diabètics. Tal i com es mostra a la Taula 18, es va observar una lleugera disminució de la hiperglicèmia diabètica en comparació amb el grup control. No obstant, no s'observaren variacions significatives entre els dos grups pel què fa als altres paràmetres sèrics.

		pControl	pGK
<u>Paràmetres</u>	glucosa (mg/dL)	892.6 ± 63.20	759.7 ± 48.38 *
<u>sèrics</u>	lactat (mM)	13.47 ± 1.839	13.02 ± 1.484
	AGL (mM)	0.947 ± 0.082	0.881 ± 0.069
	TAG (mg/dL)	177.3 ± 23.54	134.6 ± 16.06
	β-hidroxibutirat (mM)	0.144 ± 0.028	0.106 ± 0.021
	Insulina (μg/L)	< 0.08	< 0.08
<u>Metabòlits</u>	Glicogen (mg glc / g fetge)	27.01 ± 2.275	35.62 ± 2.06 *
<u>hepàtics</u>	Glc (μmol/g fetge)	40.70 ± 5.921	32.72 ± 1.475
	G6P (μmol/g liver)	0.16 ± 0.021	0.14 ± 0.018
	F2,6BP (nmol/g liver)	1.19 ± 0.215	2.84 ± 0.625 *
	Lactate (μmol/g)	1.31 ± 0.275	1.78 ± 0.424
	TAG (mg/g)	6.25 ± 0.26	6.08 ± 0.36
	AMP (μmol/g)	1.05 ± 0.054	1.01 ± 0.084
	ADP (μmol/g)	1.03 ± 0.134	1.12 ± 0.09
	ATP (μmol/g)	0.67 ± 0.148	0.66 ± 0.065
	GSH/GSSG ratio	11.73 ± 0.87	11.81 ± 0.93

Taula 18. Determinació dels paràmetres sèrics i metabòlits hepàtics indicats, dels ratolins diabètics injectats amb pCAGGS i pGK i analitzats 48h post-injecció en estat d'alimentació. Els valors

representen la mitjana \pm error estàndard de cada grup. n= 12 i 7, respectivament. Glc, significa glucosa lliure; G6P, glucosa-6-fosfat; F2,6BP, fructosa-2,6-bisfosfat. * p<0.05, determinat per t-Student.

A continuació vam explorar el destí de la glucosa al fetge mitjançant l'anàlisi de metabòlits en extractes hepàtics. Els animals tractats amb pGK presentaven uns nivells significativament elevats de fructosa-2,6-bisfosfat i, juntament amb la tendència a l'augment del lactat hepàtic, indicaria un increment del flux glicolític. A part de tenir incrementat el consum de glucosa, els fetges dels ratolins injectats amb pGK també presentaven incrementats els nivells de glicogen (Taula 18). Aquesta senyalització de glucosa que existeix als fetges que sobreexpressen la GK explicaria la disminució observada dels nivells de proteïna PEPCK-C, la qual cosa indicaria una disminució de la via gluconeogènica en el grup injectat amb pGK. (Figura 49). A la figura es pot percebre una relació proporcional entre el grau d'expressió de GK i el grau de disminució de PEPCK-C.

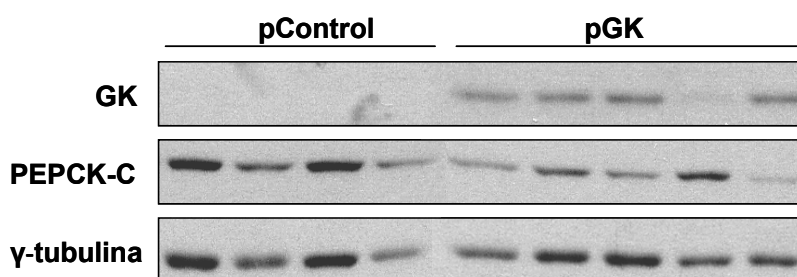


Figura 49. Western blot representatiu d'extractes de fetges de ratolins diabètics injectats amb pCAGGs i pGK i analitzats 48h post-injecció en estat d'alimentació.

No vam observar alteracions significatives a nivell del metabolisme lipídic entre els dos grups experimentals (Taula 18).

Impacte de la sobreexpressió de pGK en animals diabètics dejunats durant 5h.

En analitzar la glicèmia després de 5h de dejuni, els ratolins que sobreexpressaven pGK no presentaven una reducció significativa de la glicèmia (Taula 19). No obstant, altres paràmetres sèrics estaven alterats en comparació amb el grup control; concretament, presentaven un increment en els nivells de lactat, de TAG i AGL (Taula 19). Per tant, en aquest cas la sobreexpressió perivenosa de GK en ratolins diabètics provocava dislipidèmia tal i com havia descrit el grup d'Odoherthy *et al* en sobreexpressar GK amb adenovirus en rates sanes [270].

		pControl	pGK
<u>Paràmetres sèrics</u>	glucosa (mg/dL)	420.6 ± 49.33	348.2 ± 63.95
	lactat (mM)	7.296 ± 0.772	10.62 ± 0.608 *
	AGL (mM)	0.325 ± 0.098	0.663 ± 0.104 *
	TAG (mg/dL)	35.5 ± 7.719	74.00 ± 14.76 *
	β-hidroxitirac (mM)	0.18 ± 0.032	0.199 ± 0.014
	Insulina (µg/L)	< 0.08	< 0.08
	<u>Metabòlits hepàtics</u>	Glicogen (mg glc / g fetge)	3.858 ± 1.397
Glc (µmol/g fetge)		52.29 ± 9.524	32.23 ± 12.18
G6P (µmol/g liver)		0.06 ± 0.024	0.20 ± 0.068 *
F2,6BP (nmol/g liver)		0.71 ± 0.173	9.86 ± 1.812 ***
Lactate (µmol/g)		1.16 ± 0.239	1.28 ± 0.322
TAG (mg/g)		9.18 ± 1.48	12.56 ± 0.50
AMP (µmol/g)		1.18 ± 0.171	1.02 ± 0.095
ADP (µmol/g)		0.94 ± 0.101	1.16 ± 0.046
ATP (µmol/g)		0.49 ± 0.098	0.80 ± 0.145 *
GSH/GSSG ratio		5.372 ± 0.49	9.479 ± 1.38 *

Taula 19. Determinació dels paràmetres sèrics i metabòlits hepàtics indicats, dels ratolins diabètics injectats amb pCAGGS i pGK i analitzats 48h post-injecció després de 5h de dejuni. Els valors representen la mitjana ± error estàndard de cada grup. n= 4-8. Glc, significa glucosa lliure; G6P, glucosa-6-fosfat; F2,6BP, fructosa-2,6-bisfosfat. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, determinat per t-Student.

En analitzar els metabòlits hepàtics dels ratolins injectats amb pGK, vam detectar un increment significatiu de l'emmagatzematge de glucosa en forma de glicogen (Taula 19). Per altra banda, també presentaven incrementats els nivells de glucosa-6-fosfat, de fructosa-2,6-bisfosfat i d'ATP, la qual cosa suggeriria un increment de la via glicolítica consistent amb la tendència a incrementar el lactat hepàtic i l'increment observat de lactat sèric.

A continuació, vam avaluar el contingut proteic i els nivells de mRNA de diversos enzims i factors de transcripció clau en la regulació de la glicòlisi hepàtica. En determinar el contingut de L-PK i ub-PFK2 per *Western blot*, vam detectar un increment significatiu d'aquestes proteïnes en el fetge dels ratolins injectats amb pGK (Figura 50). A nivell de mRNA, vam observar un augment de l'expressió del gen *Gck* endogen en el grup tractat amb pGK i, en correlació, també presentaven un increment en la transcripció del gen *cMyc* (Figura 50). Altres factors com SREBP i LXRα, que segons la bibliografia poden estar implicats en la regulació de la transcripció de *Gck*, no van estar afectats pel tractament amb pGK (Figura 51).

Pel què fa al metabolisme lipídic, la sobreexpressió de GK va induir a l'acumulació de TAG al fetge (Taula 19, p=0.06, determinat per t-Student), la qual cosa és consistent amb la literatura on es descriuen fenòmens d'esteatosi hepàtica com a resultat de la sobreexpressió hepàtica de GK [116, 117, 355].

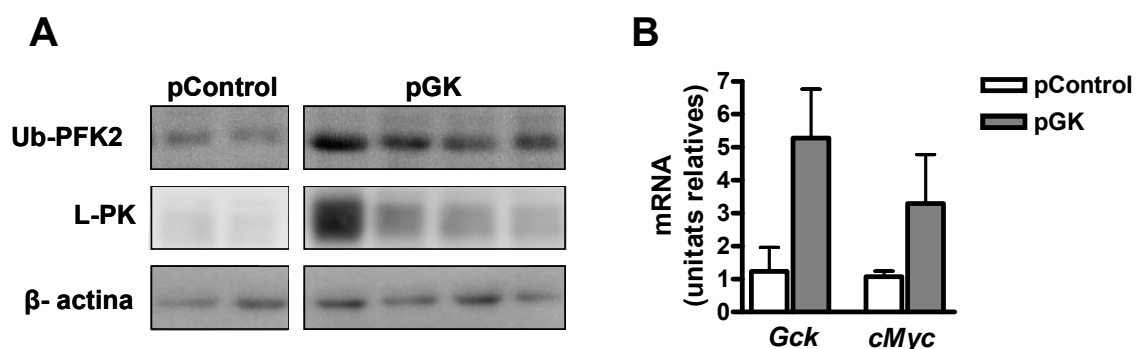


Figura 50. Anàlisi de factors claus de la glicòlisi en el fetge de ratolins diabètics tractats amb pCAGGs i pGK. A les 48 h post-injecció i després de 5 hores de dejuni, es van obtenir els fetges dels ratolins. Se'n va analitzar el contingut proteic per *Western blot* (A), on es mostra un panell representatiu. També es van analitzar per qRT-PCR els nivells de transcripció de determinats gens (B), on les barres representen la mitjana \pm error estàndard de cada grup. Es van realitzar els càlculs en relació al grup control i seguint els algoritmes del $\Delta\Delta Ct$ descrits per Applied Biosystems. n=5.

Per elucidar si l'increment dels TAG hepàtics era degut a una inducció de la síntesi de lípids en el fetge, vam analitzar els nivells d'expressió de diversos enzims i factors de transcripció involucrats en la lipogènesi *de novo*. Els fetges dels ratolins del grup pGK presentaven nivells significativament superiors de mRNA del *Fasn* i *Mod1*, i també de proteïna ACC1 i ChREBP (Figura 51). En canvi, els nivells d'uns altres factors importants en la lipogènesi com SREBP1c i LXR α (codificats per *Srebf* i *Nr1h3*, respectivament) no van variar, tal com ja s'ha esmentat anteriorment (Figura 51).

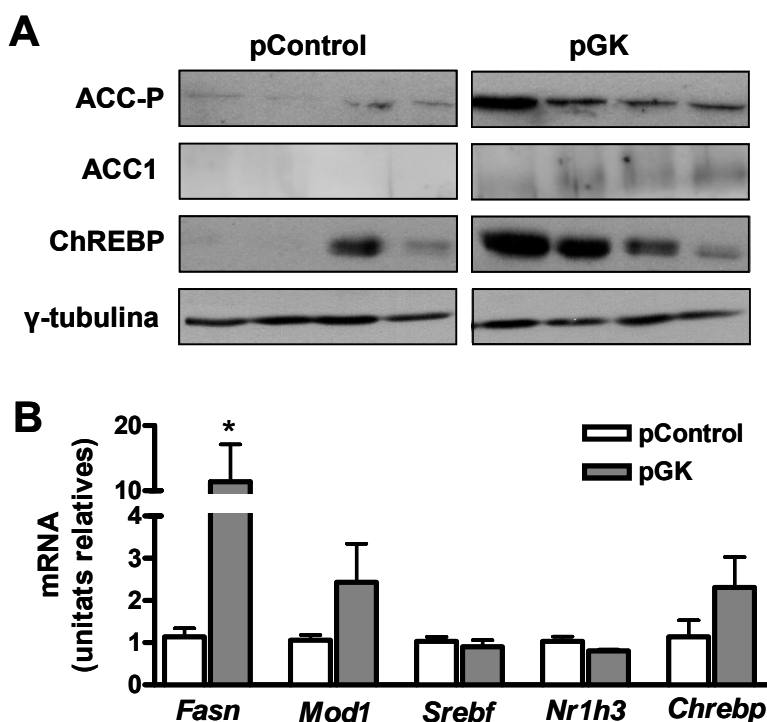


Figura 51. Anàlisi d'enzims i factors de regulació de la via lipogènica en el fetge de ratolins diabètics tractats amb pCAGGs i pGK. A les 48 h post-injecció i després de 5 hores de dejuni, es van obtenir els

fetges dels ratolins. Se'n va analitzar el contingut proteic per *Western blot* (A), on es mostra un panell representatiu. S'analitzaren els nivells d'expressió de determinats gens per qRT-PCR (B). Les barres representen la mitjana \pm error estàndard de cada grup. Es van realitzar els càlculs en relació al grup control i seguint els algorismes del $\Delta\Delta Ct$ descrits per Applied Biosystems. n=5. * p<0.05, determinat per t-Student.

La GK, a través de la producció de xilulosa-5P, indueix la inhibició de la gluconeogènesi per glucosa [34, 35]. Per altra banda, la fructosa-2,6-bisfosfat també ha estat associada a l'acció inhibidora de la glucosa sobre la gluconeogènesi [31]. Consistentment, vam observar una reducció de l'enzim principal de la gluconeogènesi, PEPCK-C (codificat per *Pck1*), a nivell de mRNA i de proteïna en els fetges dels ratolins tractats amb pGK (Figura 52). Els factors de transcripció que regulen l'expressió de la PEPCK-C, com són PGC-1 α i HNF4 α , també hi presentaven una disminució de la seva expressió (Figura 52). Com que la gluconeogènesi és una via que consumeix energia i acostuma a anar acoblada a la β -oxidació mitocondrial, vam avaluar els nivells de mRNA de *Cpt1a* els quals estaven reduïts també en el grup pGK. També presentaven una disminució dels nivells de *Ucp-2* (Figura 52). Per altra banda, vam detectar un increment en els nivells de la proteïna SOD-2 (Figura 52), involucrada en la preservació de l'estrès oxidatiu lligat al funcionament de la cadena respiratòria mitocondrial.

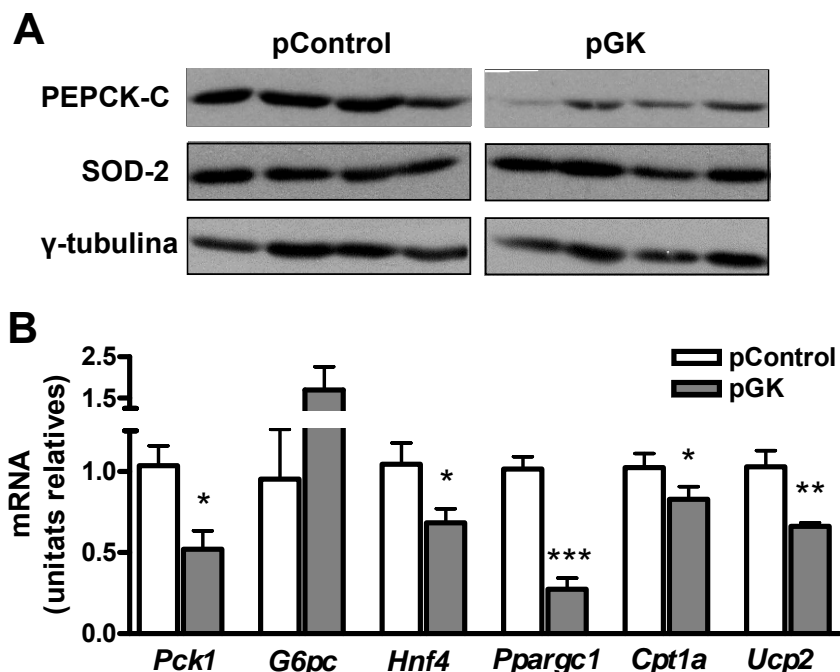


Figura 52. Anàlisi d'enzims i factors de regulació de la gluconeogènesi i el metabolisme energètic mitocondrial en el fetge de ratolins diabètics tractats amb pCAGGs i pGK. A les 48 h post-injecció i després de 5 hores de dejuni, es van obtenir els fetges dels ratolins. (A) Mostra una panell representatiu de *Western blot*. (B) Les barres representen la mitjana \pm error estàndard dels nivells d'expressió gènica analitzats per qRT-PCR i calculats seguint la metodologia del $\Delta\Delta Ct$ (Applied Biosystems) en relació al grup control. n=5. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, determinat per t-Student.

DISCUSSIÓ

La GK és el primer enzim de la via glicolítica i la seva transcripció està activada per insulina [147]. Dentin *et al* [413] han demostrat que en absència de GK, determinats gens glicolítics i lipogènics no s'indueixen en realimentar un ratolí ni amb una dieta rica en sucres. En el nostre model de diabetis induïda per STZ, els ratolins presentaven insulinèmies inferiors a 0.1 µg/L, nivells pràcticament indetectables d'expressió de GK endògena, tant a nivell de mRNA com de proteïna, i assolien glicèmies en alimentació superiors a 600 mg/dL. Per tant, es tracta d'un model en què vam poder avaluar les potencialitats terapèutiques de la sobreexpressió perivenosa de GK en el context de la diabetis tipus 1 i, a més a més, avaluar els efectes sobre l'expressió gènica de l'increment del metabolisme de glucosa independentment de la insulina.

En estat d'alimentació

En analitzar els efectes de la sobreexpressió perivenosa de GK en el context de la diabetis sempre interessa avaluar l'impacte sobre la hiperglicèmia diabètica. Vam observar que en estat d'alimentació provocava una reducció lleu però significativa de la glicèmia. Aquesta reducció podia explicar-se per dues raons: per una banda, vam detectar un augment del metabolisme hepàtic de glucosa, com es pot deduir per l'augment de fructosa-2,6-bisfosfat, i també vam detectar un increment del contingut de glicogen. Per altra banda, vam observar una disminució de la proteïna PEPCK-C, la qual podria indicar una reducció de la producció hepàtica de glucosa. No vam observar canvis significatius a nivell de lípids sèrics ni tampoc grans alteracions en l'expressió gènica.

Després de 5 h de dejuni

La sobreexpressió de GK va produir una disminució no significativa de la glicèmia, de l'ordre del 10%. En analitzar els nivells d'expressió gènica en aquests ratolins diabètics dejunats, vam corroborar el que havia descrit Matsuzaka *et al* [414], els quals havien demostrat que els animals tractats amb STZ presentaven determinats canvis d'expressió gènica com si percebessin l'estat d'alimentació-dejuni malgrat estar mancats d'insulina. Concretament, durant la transició alimentació-dejuni en animals tractats amb STZ s'observava un increment del potencial gluconeogènic i de β -oxidació en el fetge, tal i com també vam poder detectar en el nostre grup control. En canvi, el grup pGK en situació de dejuni presentava diferències respecte els controls:

1- **Increment del contingut hepàtic de glicogen:** els fetges d'aquests animals presentaven nivells significativament més alts de glucosa-6P, generats directament per l'activitat GK. La glucosa-6P regula positivament la síntesi de glicogen ja que és un activador al·lostèric de la glicogen sintasa i inhibeix la glicogen fosforilasa [12].

2- **Increment del metabolisme de glucosa:** ho indicarien els nivells elevats de fructosa-2,6-bisfosfat en el fetge, resultat de l'increment dels nivells de la proteïna ub-PFK-2. També detectàrem un increment de l'expressió d'enzims glicolítics, com són la pròpia *Gck* endògena i de la proteïna L-PK. D'entrada és un resultat previsible ja que la GK catalitza el primer pas limitant del metabolisme de glucosa cel·lular i per tant permet que es recuperi la senyalització de glucosa en el fetge diabètic la senyalització de glucosa, tal i com indiquen uns nivells incrementats de ChREBP i de *c-myc*. ChREBP, en ésser activat per la xilulosa-5P (provinent del metabolisme de glucosa a la via de les pentoses fosfat), entrarà al nucli i s'unirà a les seqüències ChoRE presents, per exemple, en el gen que codifica per a la L-PK [23].

La inducció de l'expressió de la *Gck* de ratolí podria explicar-se de dues maneres. En primer lloc, per l'increment dels nivells de fructosa-2,6-bisfosfat. La fructosa-2,6-bisfosfat, a més de la seva funció clàssica d'actuar d'activador al·lostèric de l'enzim glicolític PFK-1 i d'inhibidor de l'enzim gluconeogènic fructosa-1,6-bisfosfatasa, pot actuar de regulador de l'expressió gènica d'enzims metabòlics clau com la GK [33, 402]. Per altra banda, l'increment de l'expressió del factor de transcripció c-Myc podria causar també la inducció de l'expressió de *Gck* [415, 416].

3- **Disminució de la gluconeogènesi i de la β -oxidació d'àcids grassos:** tal com es pot deduir de la disminució dels nivells d'expressió de *Pck1* (codifica per a PEPCK-C), *Ppargc1a* (codifica per a PGC1 α) i *Cpt1a*. Aquests resultats donen suport al concepte que la sobreexpressió de GK indirectament provoca la inhibició de la gluconeogènesi i la β -oxidació d'àcids grassos, tal i com es va descriure al treballs de Ferre *et al* [116] i de Morral *et al* [354]. Consistentment a la reducció de la β -oxidació, vam detectar nivells més elevats d'AGL i TAG sèrics que en els controls, però no vam detectar canvis en els nivells de β -hidroxibutirat.

Existeixen diferents evidències que justifiquen com l'increment del metabolisme de glucosa al fetge pot provocar la inhibició de la gluconeogènesi.

- l'augment dels nivells de fructosa-2,6-bisfosfat, fruit d'un augment del flux glicolític, podria explicar la inhibició d'enzims gluconeogènics. S'ha demostrat que la producció d'aquest metabòlit en el fetge de ratolins diabètics té unes funcions mimètiques a les de la insulina a l'hora d'inhibir la gluconeogènesi [31-33].
- l'augment del factor de transcripció c-Myc: en estudis de sobreexpressió de c-Myc en el fetge de ratolins amb diabetis tipus 1, es va demostrar que c-Myc pot inhibir la gluconeogènesi i la cetogènesi [415, 416].

- la inducció de ChREBP: abans del seu descobriment ja es va determinar que algun factor de transcripció activat per la xilulosa-5P mitjançava la inhibició de la gluconeogènesi en resposta a la glucosa [34-36].

D'entrada és difícil avaluar si els elements esmentats formen part d'un mateix procés, o bé si realitzen accions individuals o bé si actuen de manera sinèrgica.

4- Inducció de la lipogènesi hepàtica: La sobreexpressió de GK va provocar la inducció del factor de transcripció ChREBP, el qual s'uneix a les seqüències ChORE presents als promotors de gens lipolítics com FAS, ACC [22]. Consistentment, els fetges que expressaven GK presentaven uns nivells incrementats de proteïna ACC i de l'expressió dels gens *Fasn* (codifica per FAS) i *Mod1* (codifica per l'enzim màlic), importants en la síntesi de lípids a partir de glucosa.

És interessant destacar que la sobreexpressió de GK no induïx l'expressió de SREBP-1c, ja que l'activitat GK genera un senyal de glucosa independent d'insulina en els fetges diabètics, com també ho van demostrar Scott *et al* [271] en animals sans dejunats. Tant Dentin *et al* [413] com Okamoto *et al* [36] demostren que la presència o no d'activitat GK no afecta l'expressió de SREBP-1c, el qual és regulat directament per la senyalització d'insulina. En canvi, els nostres resultats difereixen dels de Morral *et al* [354] segons els quals els fetges que sobreexpressaven GK presentaven una inducció de SREBP-1c. Una possible explicació d'aquest fet seria que la inducció de SREBP-1c fos secundària a la sobreexpressió de la GK, tal com va succeir en la primera part d'aquest capítol en què observàvem que la inducció de SREBP-1c podia ésser deguda a l'increment de LXR α .

La inducció de la lipogènesi es corresponia amb un lleuger increment del contingut de TAG hepàtics en el grup pGK, fenotip que també s'havia descrit en altres estudis de sobreexpressió de GK mitjançant adenovirus [354, 355].

En conclusió, els nostres resultats indiquen que l'estimulació del metabolisme de glucosa en el fetge diabètic mitjançant la sobreexpressió de GK als hepatòcits perivenosos té un efecte lleu sobre la glicèmia. Potser perquè els nivells de sobreexpressió assolits amb la transfecció hidrodinàmica són baixos. No obstant, la presència d'activitat GK en els fetges diabètics va generar senyalització de glucosa que va conduir a la inducció de lipogènesi hepàtica la qual, conjuntament amb la inhibició de la β -oxidació, va conduir a dislipidèmia i a esteatosi hepàtica. Per tant, tot i que el nostre model és el primer que té en compte la zonació hepàtica, es confirmen els resultats obtinguts prèviament amb adenovirus [270, 271, 354, 355] segons els quals la sobreexpressió hepàtica de GK seria una estratègia per a la teràpia de la diabetis amb uns efectes secundaris no desitjables sobre el metabolisme lipídic.

CAPÍTOL 2

SOBREXPRESSION DE GK_{A456V} A LA ZONA PERIVENOSA DEL FETGE

INTRODUCCIÓ

La GK exerceix un paper central en el control de la homeòstasi de glucosa, tal i com posen de manifest diverses mutacions d'aquest enzim que generen malaltia. Concretament, les mutacions activadores provoquen un desordre clínic heterogeni d'hiperinsulinèmia i hipoglicèmia també conegut amb el nom de Hipoglicèmia i hiperinsulinèmia persistents en la infància (*PHHI, Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy*). Les formes més greus de la patologia es tracten mitjançant pancreatectomies parcials i les més lleus, amb fàrmacs que inhibeixen l'alliberament d'insulina. És a dir, bàsicament s'intenta paliar els efectes de l'activació de la GK a la cèl·lula β pancreàtica, clau en la síntesi i secreció d'insulina. Per altra banda, existeixen estudis que defineixen les propietats cinètiques i també el GSIR (*Glucose-stimulated insulin release*) de les 13 mutacions activadores descrites fins a l'actualitat causants de PHHI [144]. En conseqüència, podríem resumir que la cèl·lula β pancreàtica és el focus d'interès principal en els casos d'activació de la GK.

Totes les mutacions activadores estan localitzades en una mateixa zona de l'enzim on, curiosament, també s'hi uneixen els activadors sintètics de GK (GKAs, descrits en la *Introducció* d'aquesta tesi). Tant les mutacions activadores com els GKAs determinen que la GK adquireixi una conformació tancada, d'acord amb el model de Kamata *et al* [136], la qual explica les característiques cinètiques d'activació de la GK: un increment de l'afinitat per a la glucosa i una pèrdua de la cooperativitat. L'activació de la GK mitjançant l'administració de GKAs ha estat testada per a la seva potencialitat com a teràpia per a la diabetis de tipus 2, tenint en compte principalment la seva capacitat d'incrementar el GSIR (*glucose-stimulated insulin release*) a la cèl·lula β [137, 180, 357, 417].

En general, l'estudi de l'activació de la GK s'ha centrat en la cèl·lula β . Però cal considerar que tant les mutacions activadores com els GKAs també activen la GK hepàtica, malgrat que no existeix informació sobre quins poden ésser els efectes directes d'aquesta activació al fetge. Per aquest motiu, ens vam proposar usar el nostre model d'injecció hidrodinàmica per sobreexpressar una forma de GK mutada al fetge i així poder avaluar les conseqüències de l'activació de la GK sobre el metabolisme hepàtic, sense interferències de l'augment d'insulinèmia fruit de l'activació de la GK pancreàtica. En funció dels resultats obtinguts podríem valorar la possibilitat d'emprar l'activació de GK específicament al fetge com a teràpia per a la diabetis tipus 2, per a aquells casos de diabetis en què la inducció de la secreció d'insulina ja no és possible a causa del desgast de la cèl·lula β .

Concretament, en el nostre estudi vam emprar la mutació activadora A456V (GK_{A456V}) que fou descrita en una família que patia PHHI el 2002 per Christesen *et al* [247] i estava ben caracteritzada cinèticament. Es tracta d'una mutació puntual a l'exó 10 amb herència autosòmica-dominant.

1. OBTENCIÓ I AVALUACIÓ *in vitro* DE LA GK_{A456V} DE RATA

Després d'haver comprovat i confirmat l'elevada homologia de seqüència que presenta la GK entre les diferents espècies de mamífers, vam introduir la mutació A456V descrita en la GK humana al gen de la GK de rata, el qual teníem a disposició en el nostre laboratori. La GK_{A456V} humana presenta un canvi nucleotídic d'una timina per una citosina que dóna lloc al canvi aminoacídic d'una valina per una alanina al codó 456. A l'hora d'introduir el canvi nucleotídic esmentat a la seqüència del gen de la GK de rata vam emprar la tècnica de **mutagènesi dirigida per PCR** amb els encebadors que contenen la mutació, tal i com es mostra a la figura 53 A i com es descriu a l'apartat de *Material i Mètodes*. L'adquisició de la mutació A456V a la GK de rata va ésser confirmada mitjançant la seqüenciació total del plasmidi obtingut (Figura 53 B), que també va permetre corroborar que el procés de mutagènesi no havia ocasionat cap altra alteració en la seqüència del plasmidi.

És important destacar que els encebadors de qRT-PCR i els anticossos per a GK de què disposàvem al laboratori també eren útils per a detectar la GK_{A456V}, ja que s'unien a regions de la GK llunyanes al lloc de la mutació.

A continuació, calia comprovar si la proteïna GK_{A456V} de rata s'expressava correctament, si era funcional i si presentava unes **proprietats cinètiques** similars a la GK_{A456V} humana, bàsicament una major afinitat per a la glucosa que la GK silvestre. Amb aquesta finalitat vam realitzar 3 transfeccions independents mitjançant PEI de les construccions pGK_{A456V} i pGK en cèl·lules Huh7. Passades 48 hores de la transfecció es va determinar l'activitat GK dels homogenats cel·lulars a diferents concentracions de glucosa i també es va avaluar el contingut proteic de GK i GK_{A456V} dels homogenats per *Western blot*. En el cas de l'activitat GK, els homogenats cel·lulars de les cèl·lules Huh7 transfectades amb pGK_{A456V} presentaven una major activitat GK sobretot a baixes concentracions de glucosa que els homogenats de les cèl·lules transfectades amb pGK. Ara bé, els nivells d'expressió del transgen assolits en les tres transfeccions foren diferents. Per tal d'anivellar els resultats, vam realitzar la representació de l'activitat GK com a percentatge d'activitat GK a cada concentració de glucosa versus l'activitat màxima assolida a la concentració de glucosa més alta. Per poder comparar l'activitat de la GK i la GK_{A456V} també

ens calia estar segurs que a la cuß de reacció hi havia una quantitat similar de proteïna GK i GK_{A456V}, per la qual cosa vam corregir els resultats d'activitat per la quantitat de proteïna estimada en una anàlisi densitomètrica del *Western blot* (Figura 54). Amb totes aquestes correccions, vam poder estimar que la proteïna GK_{A456V} de rata presentava una major afinitat per a la glucosa que la GK silvestre tal i com s'havia descrit per a la GK i la GK_{A456V} humanes.

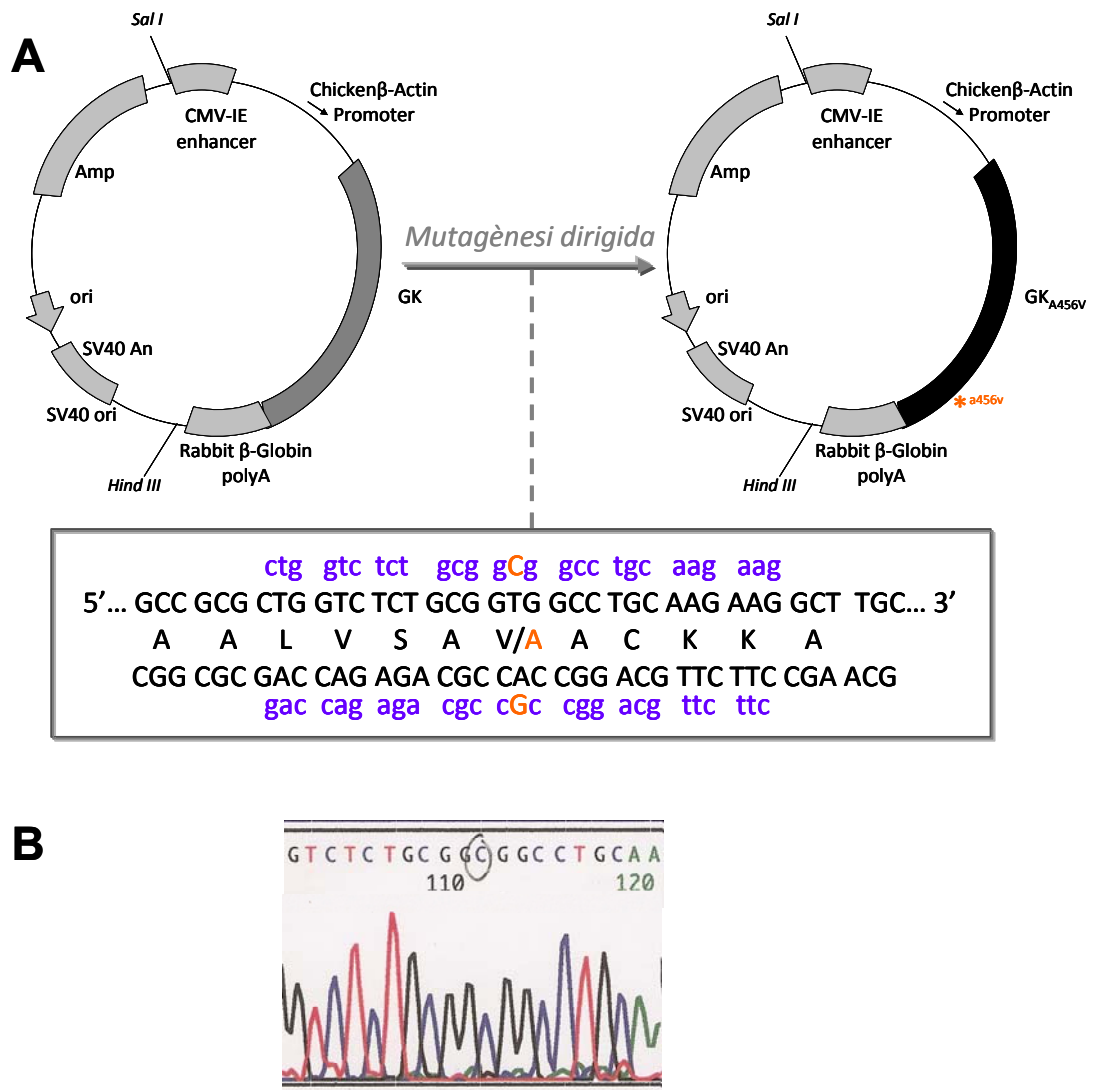


Figura 53. Figura representativa de la mutagènesi dirigida que fou aplicada al vector d'expressió pCAGGs/GK (pGK) per introduir-hi el canvi nucleotídic d'una timina per una citosina al codó 456. En blau es mostren encebadors emprats en la PCR mutagènica. Els canvis nucleotídics i aminoacídics que presenta la GK_{A456V} respecte la GK s'indiquen en taronja (A). També es mostra el fragment on es troba la mutació d'un cromatograma obtingut en la seqüenciació de comprovació del vector pGK_{A456V} (B).

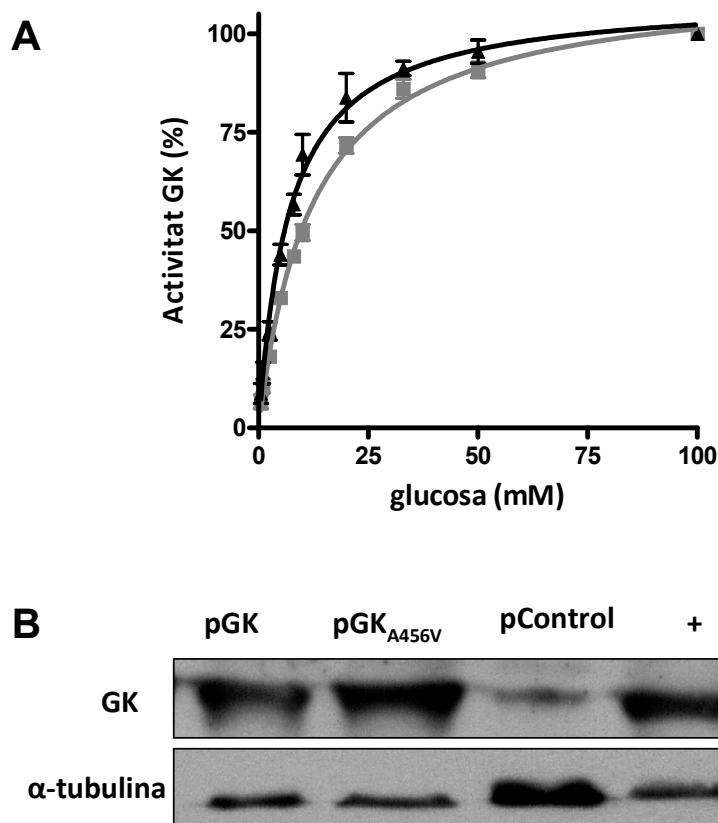


Figura 54. Anàlisi de l'activitat de pGK i pGK_{A456V} en cèl·lules Huh7. (A) Comparativa entre l'activitat GK a diferents concentracions de glucosa d'extractes de cèl·lules Huh7 que han estat transfectades amb pGK (color gris) i amb pGK_{A456V} (en negre), respectivament. Per tal d'igualar diferències entre 3 transfeccions independents, s'ha expressat l'activitat GK com a percentatge d'activitat GK a cada concentració de glucosa versus l'activitat màxima assolida a concentració de glucosa 100 mM. Els homogenats d'activitat també van ésser avaluats per *Western blot*, l'anàlisi densitomètrica dels quals va ésser usada com a normalitzador de la quantitat de proteïna GK en l'assaig d'activitat GK. (B) Es mostra un panell representatiu del *Western blot* on el carril pControl correspon a un homogenat de cèl·lules Huh-7 transfectades amb el plasmidi pEGFP i el "+" és el control positiu que consisteix en un homogenat hepàtic de ratolí sa i alimentat.

Les característiques cinètiques de la GK_{A456V} humana ja havien estat profundament estudiades per altres grups [247]. Per aportar nova informació, vam plantejar-nos estudiar si aquesta mutació podia alterar també les **interaccions proteïques** intracel·lulars que s'han descrit per la GK silvestre, principalment amb GKR [189], BAD [217] i la isoforma hepàtica de PFK-2 [203]. Vam realitzar un assaig d'immunoprecipitació amb l'anticòs de GK per avaluar si existia interacció amb la isoforma hepàtica de PFK-2 o amb BAD. Intentàrem també la immunoprecipitació inversa amb els anticossos de PFK-2 i BAD. Cap dels anticossos usats (GK, PFK-2 i BAD) va ser capaç d'immunoprecipitar. A continuació ens vam centrar en la interacció GK-GKR, la qual és responsable de la compartimentació de la GK entre el citosol i el nucli.

Per avaluar la **interacció entre GK_{A456V} i la GGRP**, vam procurar reproduir els experiments dissenyats pel grup de L. Agius [195] en els quals es cultivaven hepatòcits de rata en cultiu primari a baixes concentracions de glucosa per afavorir la presència de GK al nucli (retinguda per la GGRP) i, posteriorment, afegien glucosa en alta concentració i sorbitol (dins la cèl·lula es converteix en fructosa-1P la qual desestabilitza el complex GK-GGRP) per provocar la sortida de la GK del nucli. Mitjançant immunocitoquímica es visualitzava la localització cel·lular de la GK. Per tant, aquest sistema permetria avaluar si la GK_{A456V} interacciona amb la GGRP: en cas afirmatiu, s'observaria marcatge majoritari al nucli a baixes concentracions de glucosa i es perdria en afegir elevades concentracions de glucosa i de sorbitol al medi de cultiu. Per tal d'evitar interferències de la GK endògena dels hepatòcits de rata en cultiu primari, vam emprar hepatòcits de rates amb diabetis tipus 1 induïda per STZ en els quals s'ha perdut l'expressió de la GK endògena a causa de la manca d'insulina. Vam introduir-hi els plasmidis d'expressió pGK (control) i pGK_{A456V} mitjançant transfecció amb lipofectina dels hepatòcits en cultiu primari. A més, davant del dubte que la diabetis pogués afectar també els nivells de la proteïna GGRP necessària per a la localització nuclear de la GK, vam cotransfectar un plasmidi que codificava per GGRP. El protocol es mostra a la Figura 55.

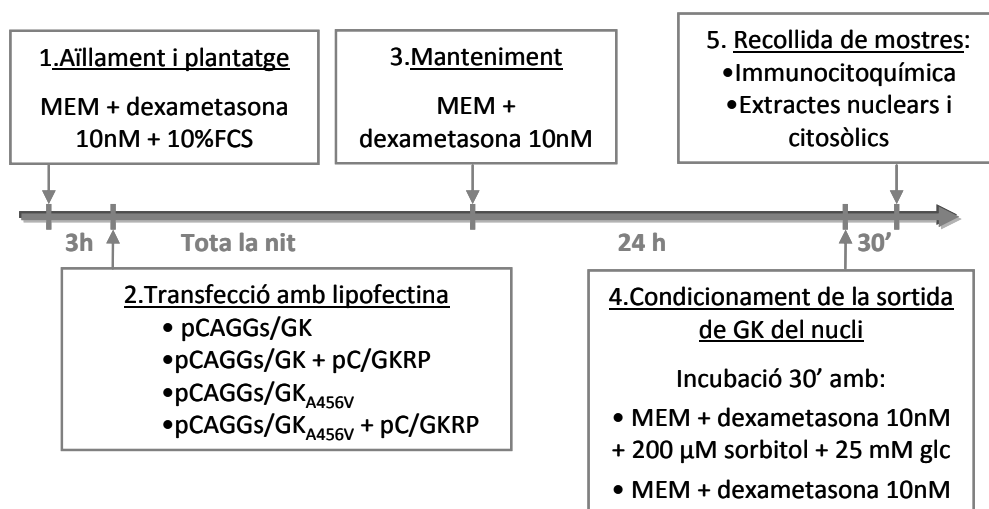


Figura 55. Esquema representatiu del protocol que es va seguir per als experiments en cultiu primari d'hepatòcits de rata diabètica tipus 1, per avaluar la possible interacció entre GK_{A456V} i GGRP.

En estudiar les diferents condicions experimentals mitjançant immunocitoquímica amb l'anticòs de la GK, vam poder observar que la GK silvestre seguia el comportament esperat d'un elevat marcatge nuclear en presència del medi basal de manteniment i un augment del marcatge citosòlic en presència d'elevades concentracions de glucosa i sorbitol [195]. No obstant també es detectà marcatge citosòlic a baixes concentracions de glucosa probablement

degut a què els nivells de sobreexpressió de GK sobrepassaren els nivells de GGRP obtinguts, ja que el vector d'expressió on estava clonat el gen de la GK era més fort que el vector d'expressió de la GGRP. Pel què fa a la GK_{A456V} presentà un marcatge eminentment citosòlic en totes les condicions estudiades (Figura 56). Aquesta manca de compartimentació nuclear que presenta la GK_{A456V} ens permeté concloure que té alterada la interacció amb la GGRP.

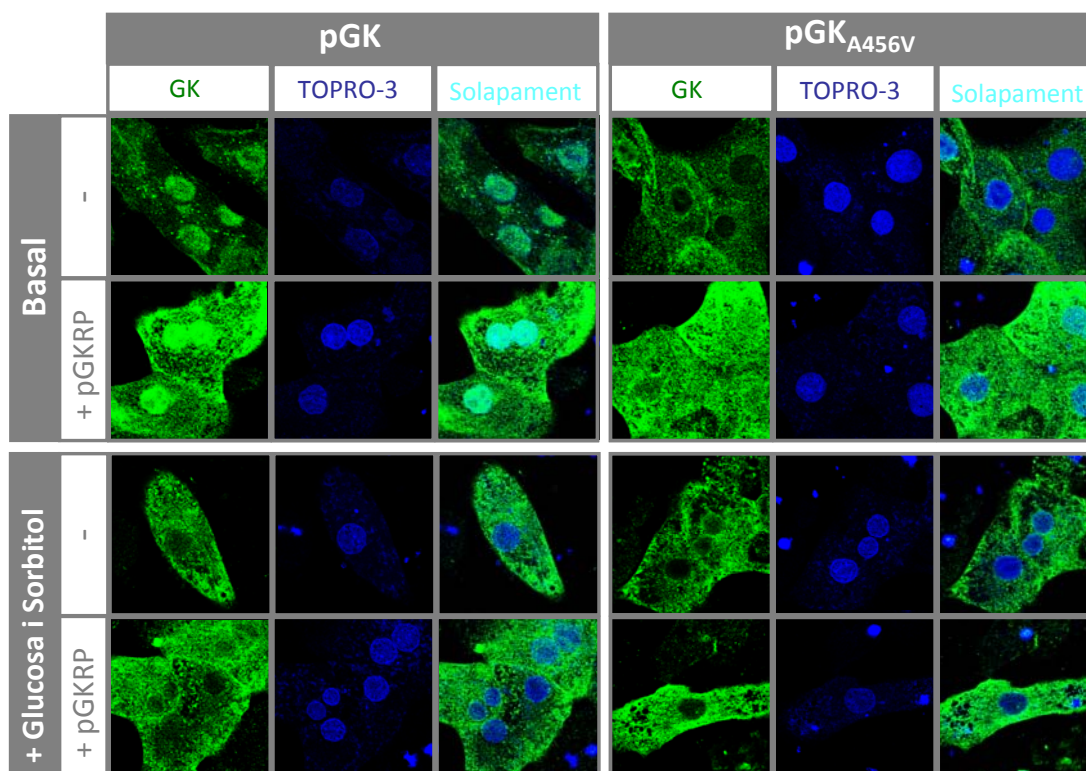


Figura 56. Avaluació indirecta de la interacció GK_{A456V}-GGRP mitjançant anàlisi immunocitoquímica de la localització cel·lular la GK_{A456V} en presència de baixes i altes concentracions de glucosa. Hepatòcits de rata amb diabetis tipus 1 van ésser transfectats amb pGK i pGK_{A456V} i, a més, en alguns pous es va cotransfectar el plasmidi pGGRP. Passades 48h de la transfecció, s'afegiren els medis indicats i finalment es va realitzar una tinció immunològica dels hepatòcits amb l'anticòs per a la GK (en verd). Es va utilitzar TO-PRO-3 per a visualitzar els nuclis (en blau). Es mostren les imatges de microscopia confocal representatives i augmentades 400X.

Paral·lelament, per tal de confirmar els resultats de la immunocitoquímica, vam obtenir extractes citosòlics i nuclears d'hepatòcits de rata diabètica transfectats amb pGK, pGK_{A456V} i pGGRP, cultivats amb el medi de manteniment. En resoldre els homogenats per *Western blot* vam poder observar que la presència de GGRP incrementava els nivells de GK al nucli mentre que no afectava el percentatge nuclear de GK_{A456V} (Figura 57). Aquests resultats doncs, reforcen les observacions realitzades per immunocitoquímica: la GK_{A456V} de rata no està regulada per la GGRP.

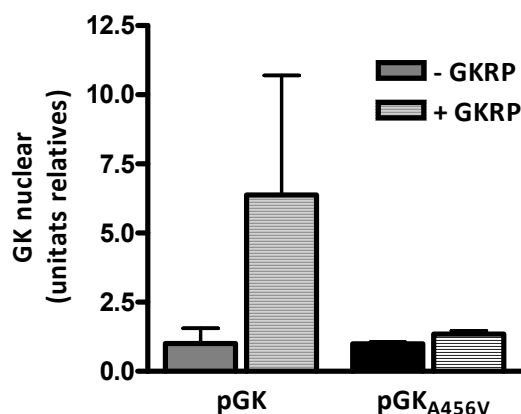


Figura 57. Avaluació de la regulació diferencial per GKR de la GK i la GK_{A456V}. Hepatòcits de rates amb diabetis tipus 1 induïda amb STZ van ésser transfectats amb pGK i pGK_{A456V}, tant en presència com en absència d'un plasmidi que codificava per GKR. Passades 24 hores de la transfecció, es van obtenir extractes nuclears i extractes citosòlics dels hepatòcits i es van resoldre per *Western blot*. El gràfic representa les unitats relatives obtingudes en l'anàlisi densitomètrica del *Western blot* pel què fa al senyal nuclear (mitjana \pm desviació estàndard) N=2.

Cal esmentar que hagués estat interessant avaluar les conseqüències metabòliques de la sobreexpressió de GK i de GK_{A456V} en aquests experiments realitzats en hepatòcits diabètics en cultiu primari, però ho impedí la baixíssima eficiència de transfecció assolida (aproximadament del 10%).

2. SOBREPRESSIÓ DE GK_{A456V} AL FETGE PERIVENÓS DE RATOLINS SANS

Per avaluar si l'expressió de la GK_{A456V} *in vivo* podia tenir efectes sobre l'homeòstasi de glucosa, inicialment vam utilitzar el model de transfecció hidrodinàmica amb diferents dosis del plasmidi nu pGK_{A456V} (30 i 100 μ g) en ratolins sans de la soca ICR (CD1). En paral·lel es van analitzar ratolins injectats hidrodinàmicament amb pGK, per tal de comparar els possibles efectes diferencials de la GK silvestre i la GK_{A456V}, així com també es van emprar ratolins controls injectats amb pControl o bé amb solució salina. En analitzar la glicèmia 24 hores post-injecció d'aquests animals en situació d'alimentació (Figura 58), vam observar que el grup pGK_{A456V} presentava una baixada significativa de la glicèmia en comparació als grups controls a totes les dosis estudiades.

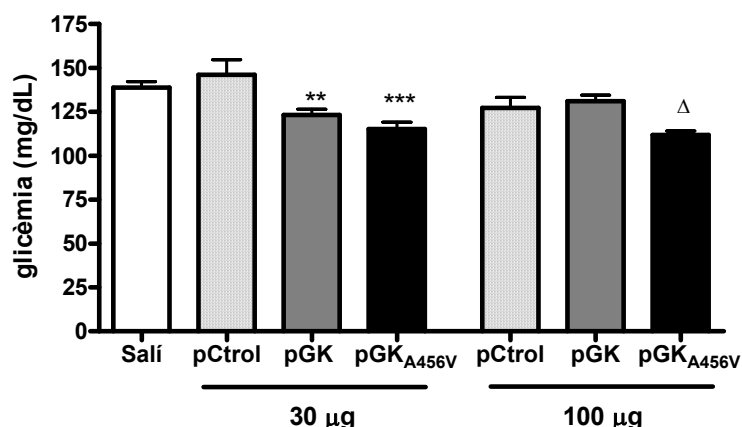


Figura 58. Avaluació dels efectes de la sobreexpressió de diferents dosis de pGK_{A456V} sobre l'homeostasi de glucosa en ratolins ICR sans a les 24 h post-injecció en situació d'alimentació. Els valors representen la mitjana ± error estàndard (n = 7 - 14 per a la dosi baixa i n = 4 per a la dosi alta) ** p<0.01 vs pCtrl ; *** p<0.001 vs pControl i p<0.01 vs Salí; Δ p<0.001 vs salí, p<0.05 vs pCtrl i pGK, determinat per One-way ANOVA.

Amb la dosi de 30 µg, s'avaluà la glicèmia i la insulinèmia 24 hores post-injecció, tant en alimentació com després d'un dejuni de 8 hores (Taula 20). També s'observà en situació d'alimentació una disminució de l'alliberament d'insulina per part del pàncrees. No obstant, la disminució dels nivells d'insulina era del mateix ordre assolit amb la injecció de pGK. En canvi, en un dejuni de 8 hores no s'observaren diferències entre els grups experimentals pel què fa a la glicèmia i a la insulinèmia.

		Glicèmia (mg/dL)	Insulinèmia (µg/L)
Alimentació	Solució salina	138.7 ± 3.448	1.312 ± 0.085
	pGK	123.1 ± 3.432 *	0.944 ± 0.070 *
	pGK _{A456V}	115.0 ± 3.915 **	0.973 ± 0.090 *
Dejuni (8 h)	Solució salina	105.5 ± 18.5	0.850 ± 0.076
	pGK	100.2 ± 6.507	0.746 ± 0.059
	pGK _{A456V}	105.9 ± 4.283	0.849 ± 0.137

Taula 20. Els valors corresponen a la mitjana ± error estàndard. N=7-14. * p<0.05 vs Solució salina, ** p<0.01 vs Solució salina, determinat per One-way ANOVA.

Tal i com ja es va comentar en el capítol 1 per a la GK silvestre, els efectes de disminució de glicèmia per pGK_{A456V} també es presentaven només a les 24 - 48 h post-injecció ja que els nivells d'expressió del transgen es perdien ràpidament en el temps. Ara bé, en sotmetre un grup de ratolins a un test de tolerància a glucosa a dia 15 post-injecció vam descobrir que els animals amb pGK_{A456V} presentaven una reducció de l'àrea sota la corba del 15% en comparació amb el grup control i del 10% en comparació amb el grup pGK (Figura 59), indicant que la

sobrexpressió de GK_{A456V} produïa una major capacitat de captació de glucosa. En determinar-ne per qRT-PCR els nivells de mRNA de la GK de rata a dia 18 post-injecció, detectàrem un augment en comparació amb el grup control (pControl, 1.217 ± 0.504; pGK, 4.874 ± 2.674; pGK_{A456V}, 5.224 ± 2.501. N=4; no significatiu per One-way ANOVA). Però no s'observà un increment d'activitat GK al fetge d'aquests ratolins (pControl, 8.910 ± 2.588; pGK, 10.87 ± 1.518; pGK_{A456V}, 8.185 ± 3.113 mU/mg de proteïna. N=4; no significatiu One-way ANOVA).

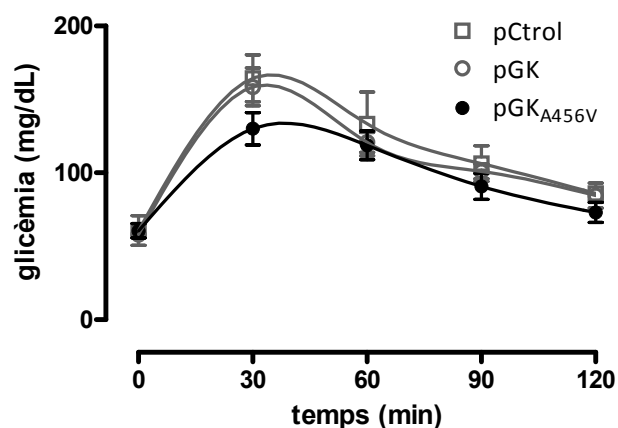


Figura 59. Test de tolerància a glucosa, dels animals injectats hidrodinàmicament amb pGK i pGK_{A456V} 15 dies post-injecció. n=4.

Tot i que a dia 18 post-injecció la sobrexpressió de GK_{A456V} no era evident, es van analitzar els paràmetres sèrics d'aquests ratolins en estat de dejuni de 6-8 hores (Taula 21). D'entrada no es detectaren diferències significatives entre els grups experimentals, però sí una tendència (p=0.14, One-way ANOVA) del grup pGK_{A456V} a tenir menors nivells de AGL i TAG en sang que el grup pGK.

	pControl	pGK	pGK _{A456V}
lactat (mM)	7.981 ± 1.616	7.361 ± 0.343	7.389 ± 0.965
AGL (mM)	0.979 ± 0.447	1.735 ± 0.345	1.263 ± 0.063
TAG (mg/dL)	81.63 ± 8.087	95.16 ± 10.46	70.03 ± 7.074
Colesterol (mg/dL)	129.00 ± 23.720	126.70 ± 9.651	109.0 ± 5.63
Urea (mg/dL)	32.00 ± 0.029	30.2 ± 1.993	32.7 ± 2.549
β- HBA (mM)	n.d.	0.085 ± 0.029	0.205 ± 0.085
ALT (U/L)	9.00 ± 3.000	4.33 ± 1.202	3.50 ± 0.745

Taula 21. Paràmetres sèrics de ratolins ICR sans en estat de dejuni de 6-8 h, 18 dies després de la injecció. Els valors representen la mitjana ± error estàndard. N=4. No hi ha diferències significatives, determinades per One-way ANOVA.

En mesurar els metabòlits hepàtics d'aquests ratolins injectats amb pGK_{A456V}, no detectàrem diferències significatives entre els grups, però sí una tendència ($p=0.15$, determinada per One-way ANOVA) a un menor contingut de glicogen i lactat i, per altra banda, a l'igual que la GK silvestre semblava induir l'acumulació de TAG al fetge (Taula 22).

	pControl	pGK	pGK _{A456V}
Glicogen (mg glc / g fetge)	75.37 ± 24.62	55.70 ± 12.42	30.73 ± 6.72
lactat (µmol / g fetge)	4.413 ± 1.059	3.470 ± 0.635	2.720 ± 0.453
TAG (mg / g fetge)	14.60 ± 1.922	18.24 ± 2.475	20.49 ± 1.303

Taula 22. Metabòlits hepàtics analitzats en ratolins ICR sans dejunats durant 6-8 h, 18 dies post-injecció. Els valors representen la mitjana ± error estàndard. N=4. No hi ha diferències significatives, determinades per One-way ANOVA.

Aquest conjunt d'experiments realitzats en animals ICR sans van servir de base per l'estudi de sobreexpressió de GK_{A456V} a llarg termini.

2.1 Estudi a llarg termini de la sobreexpressió de GK_{A456V} al fetge de ratolins sans

Tal com es va comentar al capítol 1, per obtenir una expressió prolongada del transgen vam optar per usar vectors del tipus pCpG. Per tant, en primer lloc vam haver d'obtenir la construcció pCpG/GK_{A456V} mitjançant tècniques bàsiques de clonatge. Es va comprovar l'èxit del clonatge mitjançant una seqüenciació completa del vector d'expressió per tal d'assegurar que es mantenia el canvi nucleotídic causant de la mutació A456V i que no s'havia produït cap altra alteració de seqüència durant el procés de manipulació del plasmidi. A més a més, vam confirmar *in vitro* - a través d'una transfecció en cèl·lules Huh7 - que el plasmidi pCpG/GK_{A456V} s'expressava correctament i produïa una proteïna funcional (Figura 60).

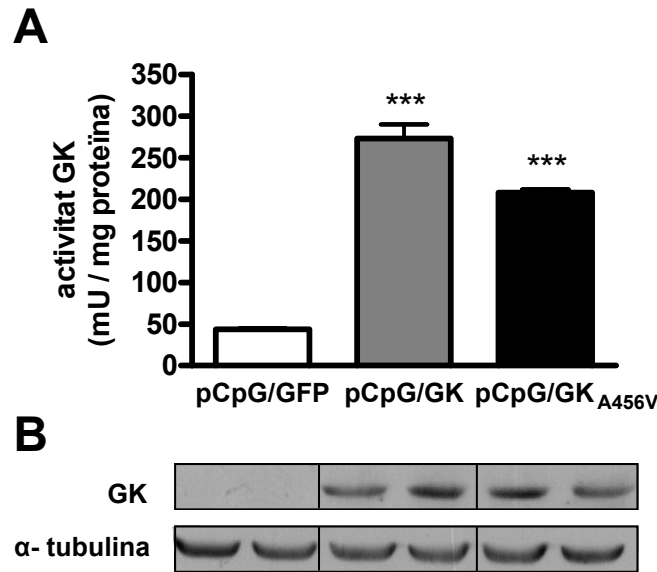


Figura 60. Sobrexpressió *in vitro* del vector pCpG/GK_{A456V}. Cèl·lules Huh7 van ésser transfectades amb les construccions indicades mitjançant lipofectina. Passades 48 h, la sobrexpressió de GK_{A456V} es va confirmar per determinació de l'activitat enzimàtica dels homogenats cel·lulars (A), i per Western blot (B). *** p<0.001 vs pCpG/GFP determinat per One-way ANOVA.

Després de constatar la funcionalitat del plasmidi d'expressió, vam procedir a la transfecció hidrodinàmica de ratolins Balb/c sans per a l'estudi funcional de la GK_{A456V} *in vivo*. S'optà pel mateix protocol de seguiment esmentat al capítol 1 per a l'anàlisi a llarg termini de la sobrexpressió de pCpG/GK i que es recorda a la Figura 61.

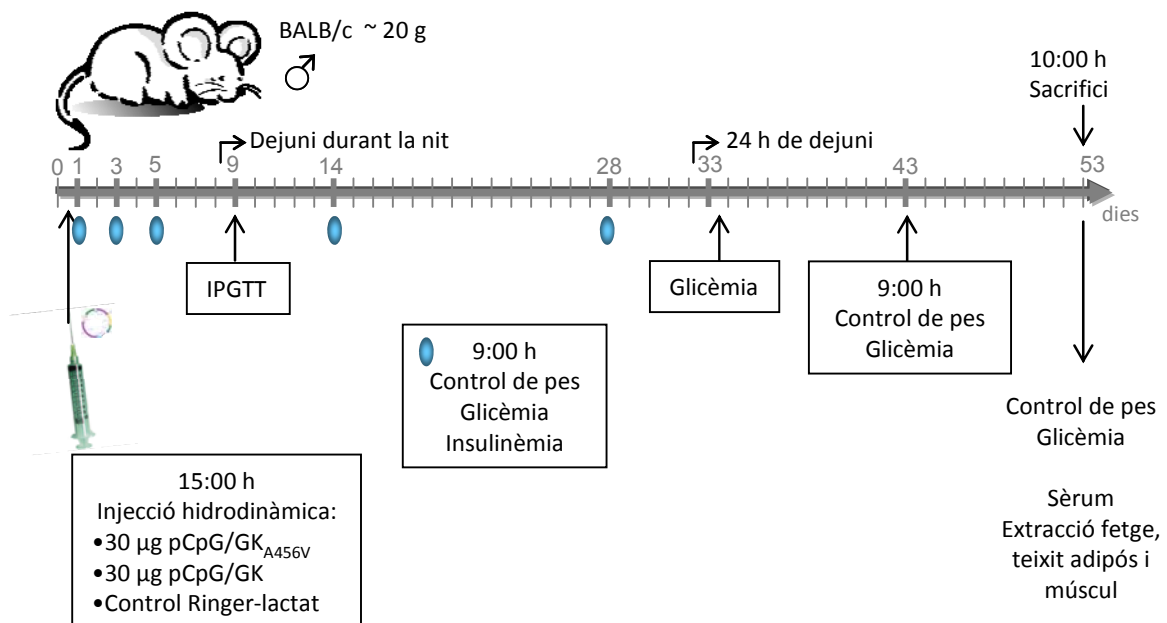


Figura 61. Protocol experimental de sobrexpressió a llarg termini de pCpG/GK_{A456V} en el fetge de ratolins sans.

El que primer ens interessà avaluar a temps final (53 dies) fou el grau de sobreexpressió de GK_{A456V} assolit en el fetge. Per qRT-PCR vam determinar els nivells de mRNA del transgen al fetge dels animals injectats amb pCpG/GK_{A456V} i observarem una gran variabilitat individual, inherent a la tècnica d'injecció hidrodinàmica (Figura 62 A). En conjunt, els fetges dels ratolins injectats amb pCpG/GK_{A456V} presentaven uns nivells de mRNA de transgen significativament superiors als del grup control i similars als obtinguts en el grup tractat amb pCpG/GK la qual cosa era important a l'hora de comparar els efectes de la sobreexpressió de les dues formes de GK. Pel què fa al contingut proteic determinat per *Western blot*, no es va apreciar cap augment substancial de proteïna GK (inclosa la GK_{A456V} sobreexpressada i la GK endògena) en els homogenats hepàtics dels ratolins injectats amb pCpG/GK_{A456V} (Figura 62 B). En canvi, en determinar l'activitat GK dels extractes proteics dels fetges del grup pCpG/GK_{A456V} detectarem un increment del 90% de l'activitat GK a 5 mM de glucosa en comparació amb el grup control, i del 40% a 100 mM de glucosa (Figura 62 C). Aquest fet, conjuntament amb l'observació que els nivells de mRNA de la GK de ratolí estaven disminuïts en els extractes hepàtics del grup pCpG/GK_{A456V} (Figura 66), indicaria que els fetges d'aquests ratolins contenen majoritàriament la GK_{A456V} malgrat que això no suposi incrementar la quantitat total de proteïna GK (entenent el total com a la suma de la GK_{A456V} sobreexpressada i de la GK endògena).

Vist que l'expressió de GK_{A456V} era evident en el fetge dels ratolins Balb/c, era interessant i novedós analitzar quin fenotip generaria. D'entrada no observarem canvis significatius de pes entre els grups experimentals (Figura 63 A). Pel què fa al seguiment de la glicèmia, la GK_{A456V} ocasionà una disminució significativa de la glucosa en sang en comparació amb el grup control en els estadis inicials de l'experiment, tal i com s'havia observat en els experiments realitzats a curt termini amb la construcció pGK_{A456V}; però aquest efecte es perdé amb el temps tot i que es mantenien nivells elevats d'expressió del transgen (Figura 63 B). En canvi, no s'observaren diferències significatives pel què fa a la insulínèmia en el transcurs de l'experiment en comparació amb el grup control (Figura 63 C), però sí que diferí significativament de la insulínèmia del grup pCpG/GK en el tram final de l'experiment (Figura 63 D)

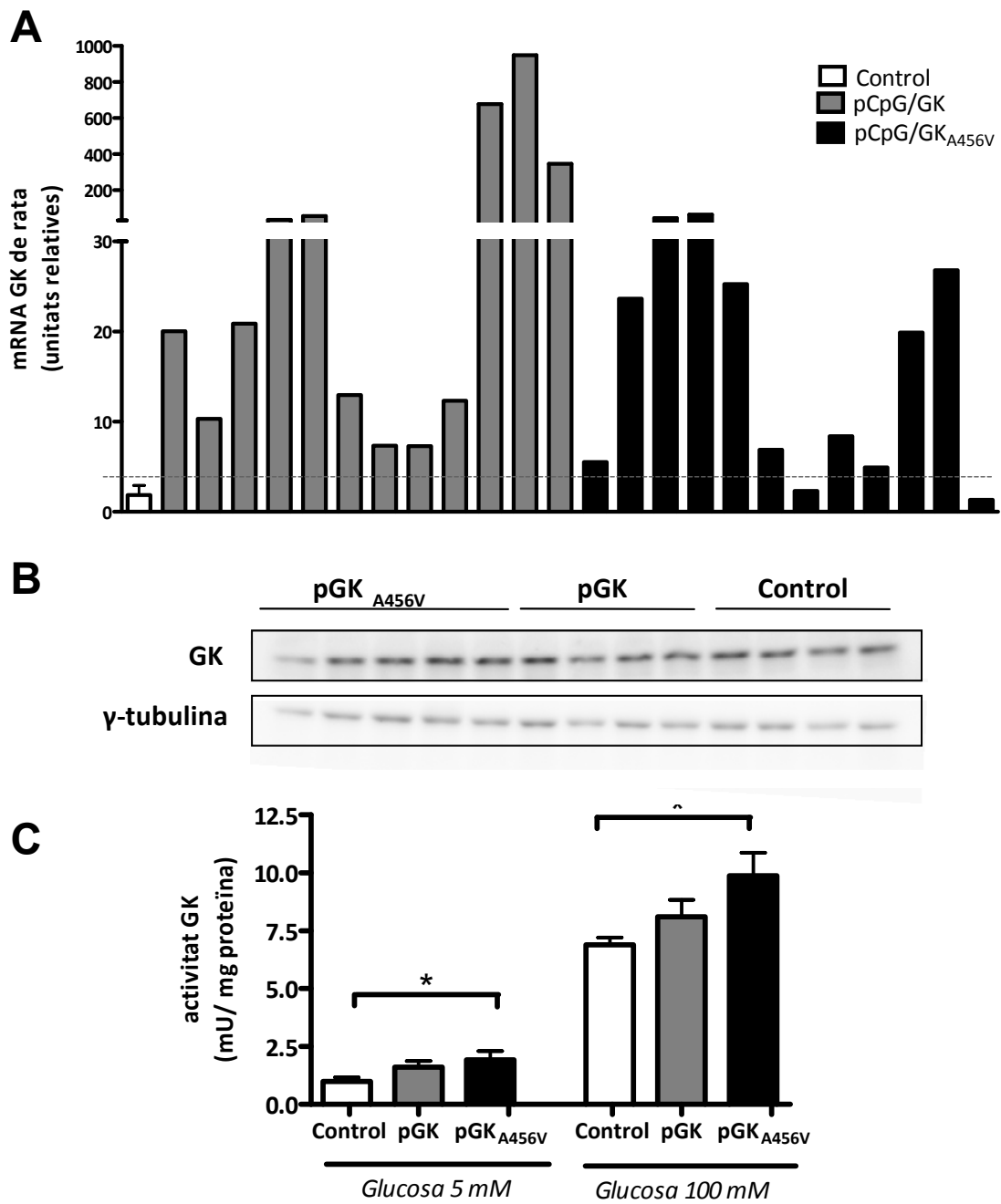


Figura 62. Sobreexpressió *in vivo* del vector pCpG/GK_{A456V} 53 dies post-injecció. Ratolins BALB/c van ésser injectats hidrodinàmicament amb 30 μ g de pCpG/GK_{A456V} per animal. Després de 53 dies de la injecció, es va determinar el contingut del transgen en el fetge per qRT-PCR (A); la quantitat de proteïna per *Western blot* (B), i l'activitat GK a les concentracions de glucosa indicades (C). * $p < 0.05$ determinat per One-Way ANOVA.

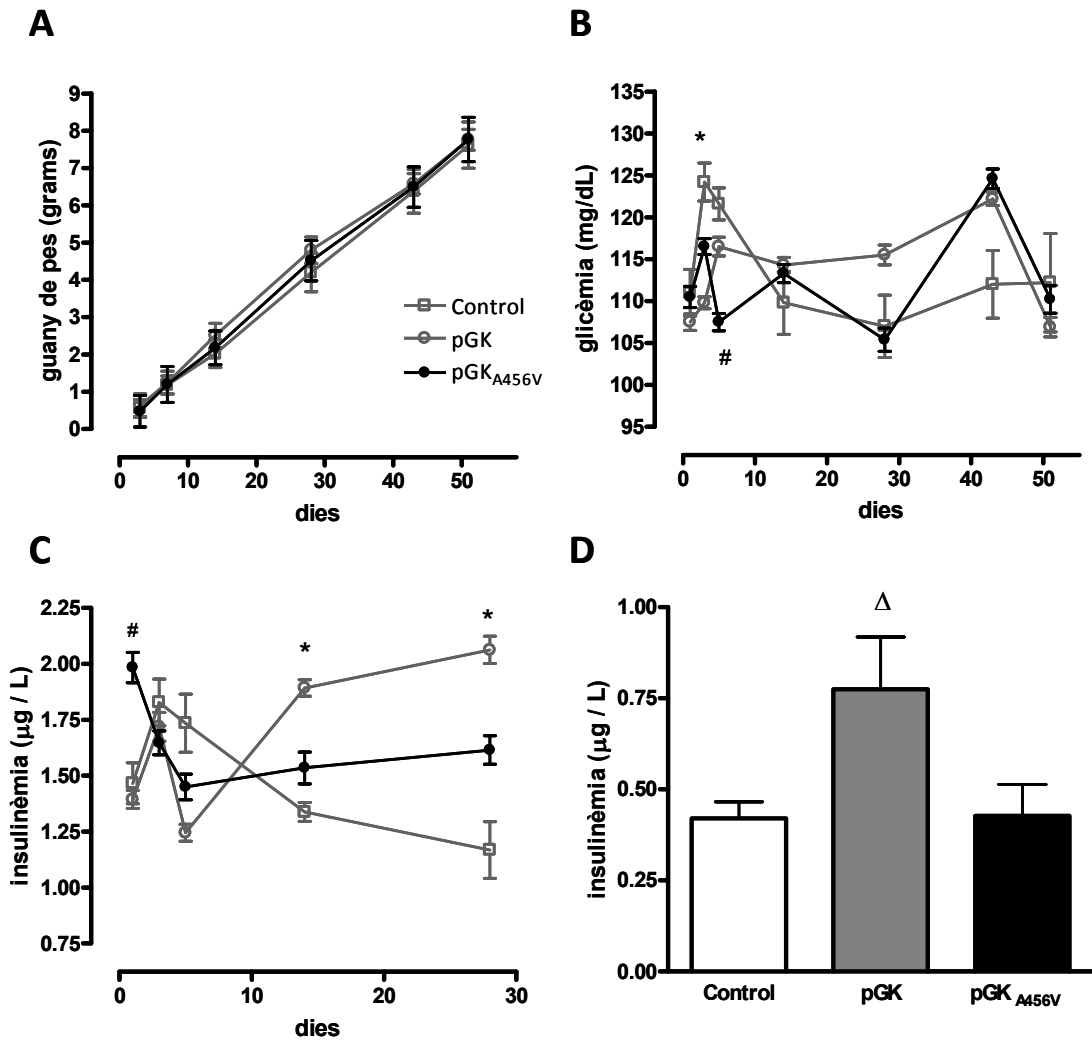


Figura 63. Evolució dels ratolins Balb/c injectats amb pCpG/GK i pCpG/GKA456V durant 53 dies post-injecció. En els dies indicats, a les 10 del matí, es determinava el (A) pes dels animals, (B) la glicèmia; i (C) es recollia plasma per a mesurar-ne la insulinèmia. (D) Mostra la insulinèmia del dia 53, que va ésser determinada en mostres de sèrum. . n=5 control i n=12 pGK i pGK_{A456V}, * p<0.05 pGK vs control; # p<0.05 pGK_{A456V} vs control; Δ p<0.05 vs control i pGK_{A456V} determinat per One-way ANOVA

Cal destacar els resultats obtinguts a dia 9 post-injecció en un test de tolerància a glucosa. Per a aquesta prova, vam dejunar els ratolins durant 16 hores i observarem que la glicèmia en dejuni dels ratolins del grup pCpG/GK_{A456V} seguia el mateix patró que la del grup pCpG/GK i eren significativament inferiors a la del grup control (Figura 64). Però en injectar el bolus de glucosa, els animals que sobreexpressaven la GK_{A456V} presentaren un pic de glucosa a 30 minuts de la injecció significativament inferior al dels altres grups, la qual cosa denotava que aquests ratolins presenten una major "clearance" de glucosa (Figura 64).

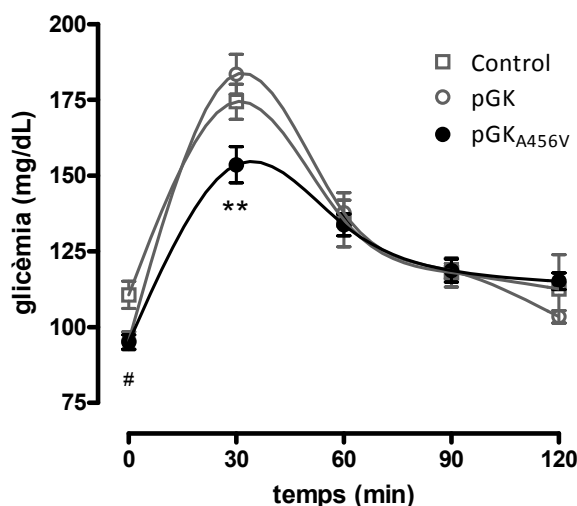


Figura 64. Test de tolerància a glucosa. 9 dies després de la transfecció hidrodinàmica de ratolins Balb/c sans amb pGpG/GK_{A456V}, es dejunaren els ratolins durant 16 hores i, a continuació, se'ls injectà intraperitonealment un bolus de glucosa. Es va mesurar la glicèmia cada 30 minuts després del bolus. La gràfica mostra la mitjana ± l'error estàndard de cada grup. N= 5 pel grup control, i N= 12 pels grups pGpG/GK i pCpG/GK_{A456V}. # p<0.05, pCpG/GK_{A456V} vs control i pCpG/GK vs ctrl; ** p<0.01 pCpG/GK_{A456V} vs pCpG/GK i p<0.05 vs ctrl, determinat per One-way ANOVA.

Cal tenir en compte que, independentment de l'efecte de la GK_{A456V} observat en el test de tolerància a glucosa, les dades de glicèmia i insulinenèmia dels ratolins del grup pCpG/GK_{A456V} a punt final no diferien de les obtingudes en els ratolins injectats hidrodinàmicament amb solució salina. En l'anàlisi d'altres paràmetres sanguinis (lactat, TAG, AGL, colesterol, β-hidroxibutirat, urea i ALT) tampoc no s'observaren diferències amb el grup control (Taula 23), excepte pel què fa a la urea que era significativament menor en el grup pCpG/GK_{A456V}. És important esmentar que la sobreexpressió de GK_{A456V} en el fetge no va generar toxicitat tal i com denoten els baixos nivells de transaminases sèriques (ALT) detectats.

	Control	pCpG/GK	pCpG/GK _{A456V}
lactat (mM)	8.76 ± 1.161	12.55 ± 0.617 *	10.96 ± 0.552
AGL (mM)	1.276 ± 0.102	0.871 ± 0.054 **	1.221 ± 0.124 ##
TAG (mg/dL)	162.0 ± 16.71	95.92 ± 7.96 **	144.1 ± 14.26 ##
Colesterol (mg/dL)	115.5 ± 4.068	109.8 ± 3.501	106.3 ± 2.502
Urea (mg/dL)	44.54 ± 1.677	47.5 ± 2.082	37.83 ± 2.768 #
β- HBA (mM)	n.d.	0.041 ± 0.009	0.042 ± 0.009
ALT (U/L)	27.44 ± 1.345	19.55 ± 1.956	22.5 ± 2.435

Taula 23. Paràmetres sèrics determinats en ratolins injectats amb pCpG/GK_{A456V} a 53 dies post-injecció. Les dades representen la mitjana ± error estàndard. N=5 pels controls i N= 12 pels altres grups * p<0.05 vs control; ** p<0.01 vs control; ## p<0.01 vs pCpG/GK, # p<0.05 vs control i vs pCpG/GK,; determinat per One-way ANOVA.

Avaluació de l'impacte de l'augment de GK_{A456V} sobre el metabolisme glucídic hepàtic

Vistos els efectes fenotípics sobre la bioquímica sanguínia ocasionats per la sobreexpressió de la GK_{A456V}, calia veure el seu paper sobre el metabolisme hepàtic. Si ens centrem en el metabolisme glucídic, vam analitzar els nivells de diversos metabòlits hepàtics relacionats directament amb el metabolisme de la glucosa. Tal com es pot observar a la figura 65, la presència de la GK_{A456V} generà un fenotip intermedi entre l'observat en el grup Control i l'observat en el grup pCpG/GK. En aquest sentit, els ratolins que expressaven la GK_{A456V} tenien uns nivells lleugerament superiors de glucosa lliure i també de glucosa-6-fosfat al fetge en comparació al grup control però lleugerament inferiors als del grup pCpG/GK, malgrat que les diferències no foren significatives. Els nivells de glicogen seguiren el patró invers, és a dir, tendiren a ser inferiors que els del grup control però superiors als del grup pCpG/GK. Els nivells de lactat hepàtic foren idèntics en tots els grups experimentals.

A continuació vam analitzar els nivells d'expressió dels gens codificants per a enzims i factors de transcripció implicats en el metabolisme de glucosa, principalment en la glicòlisi i la gluconeogènesi. Els fetges dels ratolins que sobreexpressaven la GK_{A456V} mostraven una reducció del contingut de mRNA de la GK endògena (*Gck*), de la isoforma ubíqua de PFK-2 (*Pfkfb3*), així com també del factor de transcripció c-Myc (*Myc*) (Figura 66). En el mateix sentit, els nivells de proteïna de les isoformes hepàtiques de PK i de PFK2 no variaven significativament dels del grup control, tal i com es mostra en el *Western blot* de la figura 66. En conjunt, les dades indiquen que el grup injectat amb pCpG/GK_{A456V} presentava uns nivells glicolítics similars als del grup control, si bé, amb una tendència a ésser inferiors.

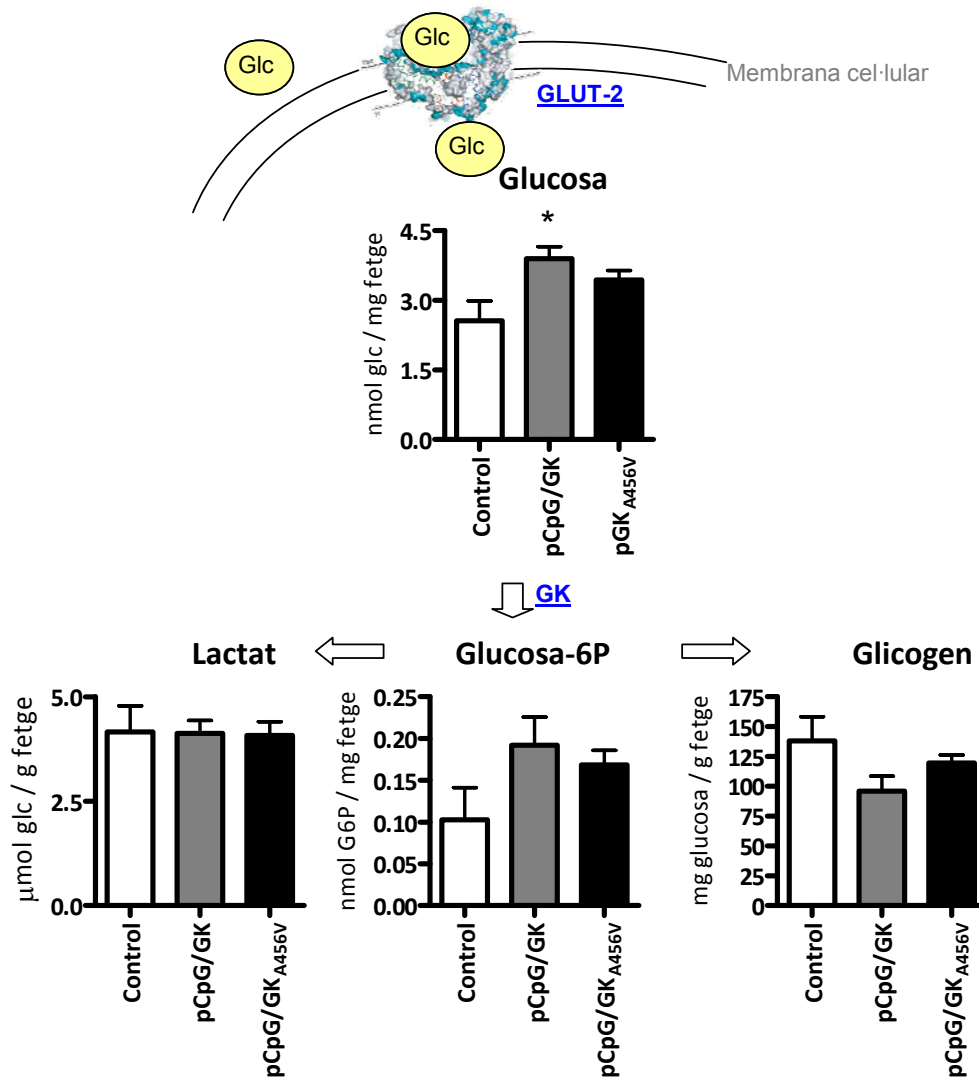


Figura 65. Determinació dels metabòlits hepàtics. 53 dies post-injecció, es van extreure els fetges dels ratolins BALB/c injectats amb pCpG/GK_{A456V} i dels controls. i es van preparar homogenats hepàtics) per analitzar-ne el contingut de glucosa lliure, glucosa-6-fosfat, glicogen i lactat. Les gràfiques representen la mitjana ± l'error estàndard; N=5 pel grup control i N= 12 pels altres grups. * p<0.05, vs Control, determinat per One-Way ANOVA.

Pel que fa a la via gluconeogènica, els nivells de mRNA d'alguns factors de transcripció importants en la regulació de la via gluconeogènica, com són HNF-4 i PGC-1 α , eren de la mateixa magnitud en els fetges dels ratolins del grup pCpG/GK_{A456V} i del grup control (Figura 66). En conseqüència, no s'observen canvis a nivell de mRNA ni a nivell de proteïna de l'enzim C-PEPCK (Pck1) (Figura 66). Tampoc no hi hagué canvis en el contingut de mRNA del transportador de glucosa GLUT-2 (*Slc2a2*), ni del factor de transcripció implicat en la seva regulació (*Foxa3*) (Figura 66). En canvi, els fetges que sobreexpressen GK_{A456V} presentaven una clara inducció de la transcripció de la glucosa-6-fosfatasa (*G6pc*), coneguda com a últim enzim de la via gluconeogènica que catalitza la reacció contrària a la GK, tant si els comparem amb el

grup control com amb el grup pCpG/GK. També es comprovà per immunohistoquímica com l'augment de la transcripció de la glucosa-6-fosfatasa es corresponia amb un augment de la quantitat de proteïna (Figura 66 C). Per tant, podem concloure que la sobreexpressió de GK_{A456V} en el fetge perivenós no genera una inducció de la via gluconeogènica però sí l'activació de la transcripció i de proteïna glucosa-6-fosfatasa.

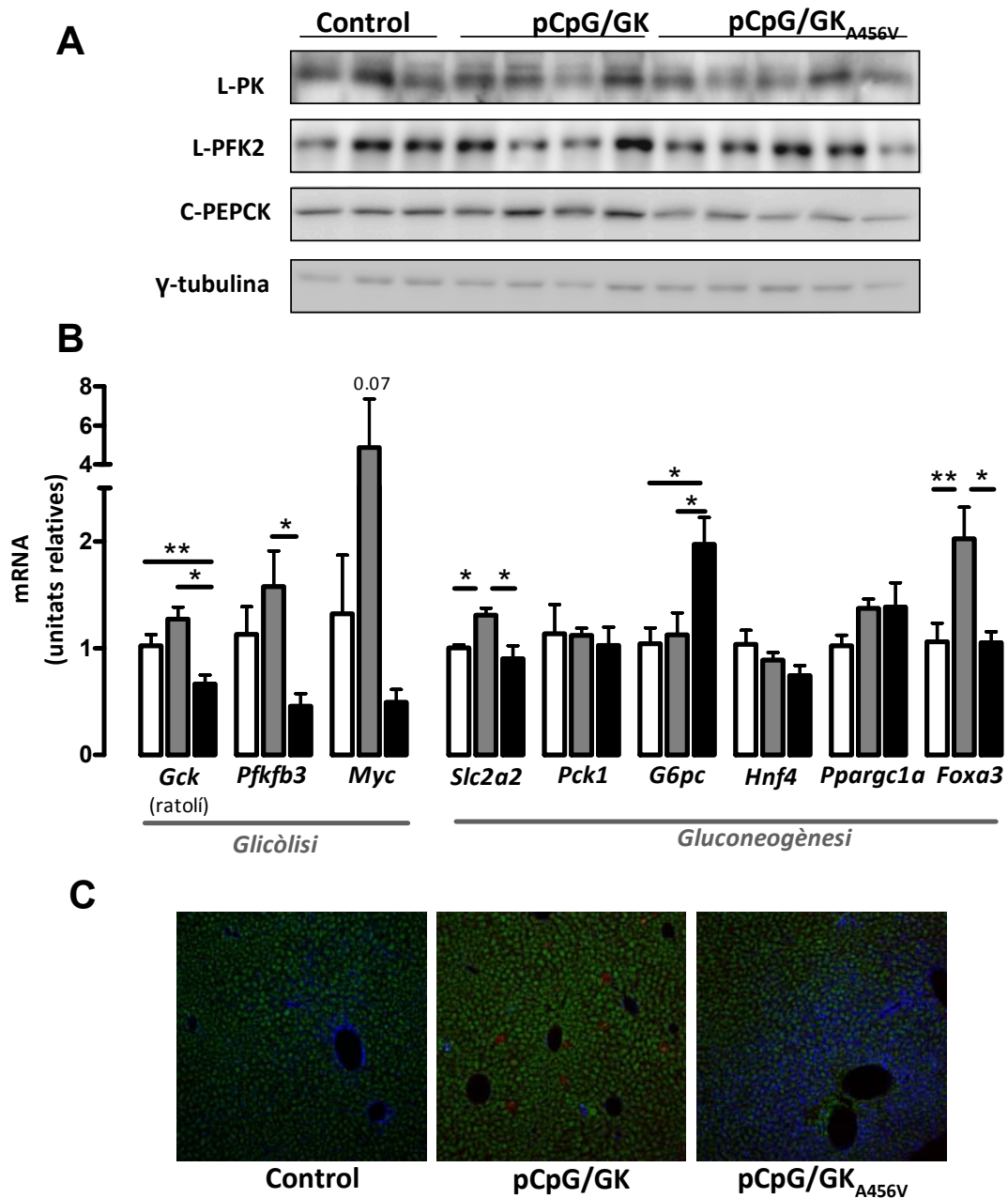


Figura 66. Anàlisi del contingut d'enzims i factors de transcripció importants en la glicòlisi i la gluconeogènesi en el fetge de ratolins que sobreexpressen la GK_{A456V} . (A) Després dels 53 dies d'experiment, es van obtenir els fetges dels ratolins i es van homogeneïtzar amb RIPA per determinar el contingut de proteïna per *Western blot*, com es mostra en aquesta imatge representativa. (B) També es determinaren els nivells relatius de mRNA dels gens indicats al gràfic. Les dades es van analitzar fent el càlcul de $\Delta\Delta Ct$ utilitzant el gen de la $\beta 2$ -microglobulina com a normalitzador. Les barres representen la

mitjana de cada grup relativa a la mitjana del grup control \pm l'error estàndard; en blanc es mostra el grup Control; en gris, el grup pGK; i en negre, el grup pGK_{A456V}. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i 0.07 significa $p = 0.07$, determinat per One-Way ANOVA ($n = 5-7$). (C) Imatges de microscopia confocal de la immunodetecció de la subunitat catalítica de la glucosa-6-fosfatasa (senyal blau) en crioseccions dels fetges. El senyal verd correspon als nuclis dels hepatòcits.

Avaluació de l'impacte de l'augment de GK_{A456V} sobre el metabolisme lipídic hepàtic

L'anàlisi sanguínia dels ratolins injectats amb pCpG/GK_{A456V} no havia revelat cap canvi en els nivells de AGL i TAG circulants. Aquest fet podia suggerir que el metabolisme lipídic no estaria alterat per la sobreexpressió de GK_{A456V}. També ho suggeriren els resultats obtinguts en la determinació de TAG hepàtics (control, 26.84 ± 1.87 ; pCpG/GK, 26.45 ± 0.90 ; pCpG/GK_{A456V}, 25.72 ± 1.59 mg/g fetge. $N = 5, 12$ i 12 , respectivament) i de AGL hepàtics (control, 17.94 ± 2.99 ; pCpG/GK, 18.60 ± 1.14 ; pCpG/GK_{A456V}, 18.70 ± 2.22 mg/g fetge. $N = 5, 12$ i 12 , respectivament) en què no s'observaren diferències significatives entre els grups.

Com que el contingut lipídic és fruit del balanç entre la lipogènesi i l'oxidació d'àcids grassos, malgrat que el balanç lipídic fos igual en els grups pCpG/GK_{A456V} i control, vam decidir avaluar si aquestes vies estaven alterades en els ratolins que sobreexpressaven la GK_{A456V}. Per aquest motiu determinarem el contingut hepàtic de mRNA de diversos enzims i factors de transcripció implicats en el metabolisme lipídic (Figura 67). Vam observar que els nivells dels enzims lipogènics FAS (codificat per *Fasn*) i enzim màlic (codificat per *Mod1*) no variaven respecte el grup control, malgrat que els mRNAs d'alguns factors de transcripció lipogènics com LXR- α (codificat per *Nr1h3*) i SREBP-1c (codificat per *Srebf1*) estiguessin incrementats. Però altres factors implicats en la lipogènesi hepàtica seguien patrons diferents: per una banda no hi hagué diferències significatives entre els grups pel què fa a ChREBP i, en canvi, el grup GK_{A456V} presentà una gran disminució dels nivells de PPAR- γ (codificat per *Pparg*). Per tant, no observarem una activació de la via lipogènica. En conseqüència tampoc no hauria d'estar alterada la via d'oxidació dels àcids grassos, tal i com es manifesta amb els nivells estables de mRNA per Cpt-1 α (codificat per *Cpt1a*) presents al fetge dels animals que sobreexpressen la GK_{A456V}, en comparació amb el grup control.

Sorprenentment, vam detectar una disminució significativa de l'expressió del gen que codifica per a la HmgCoA sintasa (*Hmgcs2*), principal gen implicat en al cetogènesi hepàtica, en els ratolins del grup pCpG/GK_{A456V} (Figura 67). De manera que a igual β -oxidació que els controls, el grup que sobreexpressa la GK_{A456V} presentaria menor capacitat de producció de cossos cetònics.

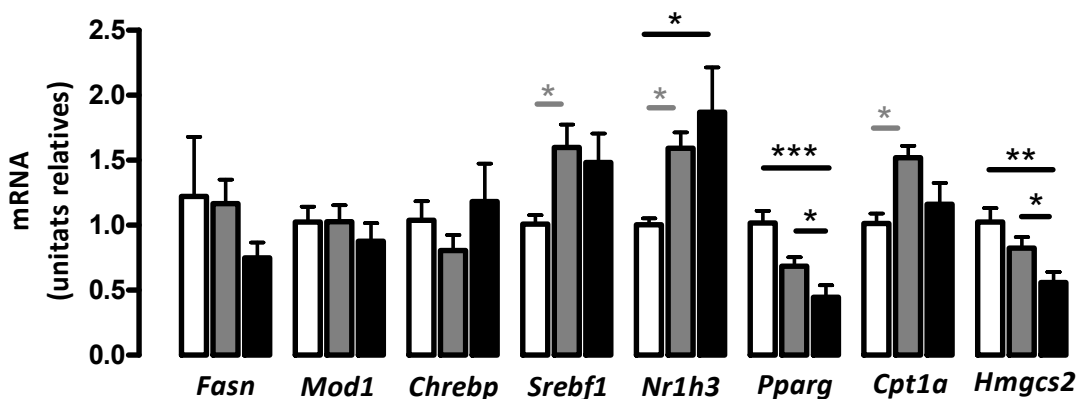


Figura 67. Mesura de l'expressió de gens implicats en la lipogènesi i en la utilització d'àcids grassos. Les barres representen la mitjana de cada grup relativa a la mitjana del grup control \pm l'error estàndard. Les dades es van analitzar fent el càlcul de $\Delta\Delta Ct$ (Applied Biosystems) utilitzant el gen de la $\beta 2$ -microglobulina com a normalitzador. En blanc es mostra el grup Control; en gris, el grup pGK; i en negre, el grup pGK_{A456V}. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i $p < 0.001$, determinat per One-Way ANOVA ($n=5-7$).

Avaluació del metabolisme energètic i mitocondrial en els fetges que sobreexpressen GK_{A456V}

A continuació vam voler valorar si la sobreexpressió de GK_{A456V} podia tenir algun efecte sobre el contingut energètic cel·lular, malgrat que no havíem observat canvis en les vies glucolítiques, gluconeogèniques, lipogèniques i oxidatives avaluades indirectament. Per aquest motiu vam determinar els nivells d'AMP, ADP i ATP en el fetge dels ratolins i vam realitzar el càlcul de la càrrega energètica cel·lular. En concordança amb les observacions realitzades, el grup de ratolins injectats amb pCpG/GK_{A456V} i el grup dels controls tampoc no diferiren significativament pel què fa al contingut d'aquests nucleòtids (Taula 24).

	Control	pGK	pGK _{A456V}
AMP ($\mu\text{mol} / \text{g fetge}$)	0.784 \pm 0.063	0.980 \pm 0.130	0.856 \pm 0.056
ADP ($\mu\text{mol} / \text{g fetge}$)	0.965 \pm 0.055	0.941 \pm 0.051	0.965 \pm 0.036
ATP ($\mu\text{mol} / \text{g fetge}$)	1.033 \pm 0.134	0.757 \pm 0.172	1.104 \pm 0.107
càrrega energètica cel·lular	0.510 \pm 0.016	0.461 \pm 0.029	0.522 \pm 0.014

Taula 24. Determinació del contingut energètic dels fetges dels ratolins que sobreexpressen la GK_{A456V} a llarg termini. Les dades representen la mitjana \pm error estàndard. $N= 5, 6$ i 6 , respectivament. No es detectaren diferències significatives entre els grups per One-Way ANOVA.

Pel què fa a l'avaluació mitocondrial, vam seguir l'estudi de respirometria d'alta resolució esmentat al Capítol 1 i detallat a l'apartat de *Material i mètodes* d'aquesta tesi. Les dades presentades a la figura 68 mostren com els fetges dels ratolins que sobreexpressen la GK_{A456V} tenen un major flux respiratori a través del complex I que del complex II en comparació amb

els controls, tal i com indica el *ratio* Complex I/Complex II. Per altra banda, s'hi observa un increment no significatiu del consum d'oxigen extra-mitocondrial. Les dades han estat normalitzades per COX, el contingut de la qual dóna idea del nombre de cadenes respiratòries en funcionament. Un altre indicador del nombre de cadenes respiratòries pot ésser VDAC (transportador bidireccional de nucleòtids depenent de voltatge), però vam detectar-ne un increment significatiu del contingut proteic als fetges dels ratolins que sobreexpressen la GK_{A456V} (Figura 68 D) (resultats de l'anàlisi densitomètrica (unitats relatives): 0.113 ± 0.001, pel grup control; 0.064 ± 0.007, pel grup pCpG/GK; 0.219 ± 0.030, pel grup pCpG/GK_{A456V} #, p<0.05 vs control i p<0.01 vs pCpG/GK, determinat per One-Way ANOVA).

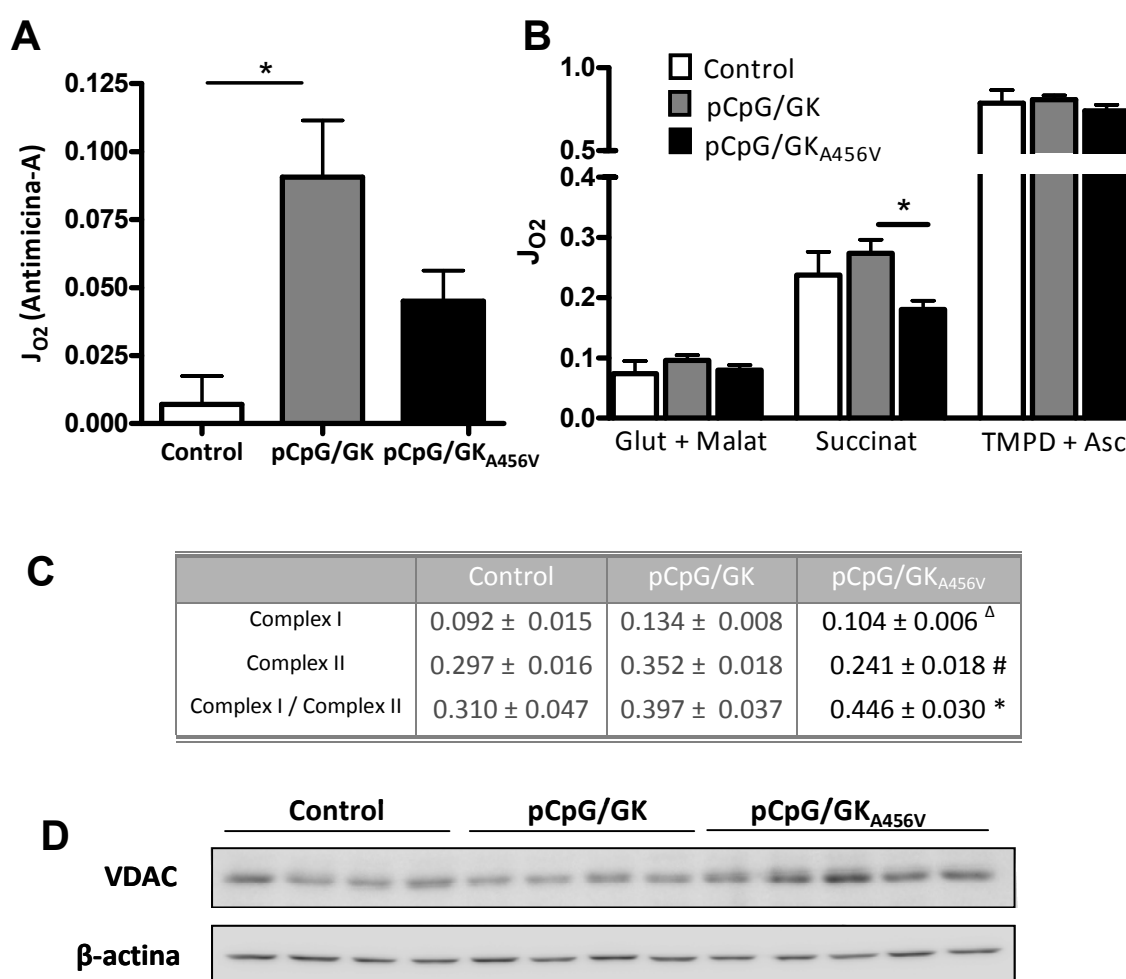


Figura 68. Avaluació de la funció mitocondrial dels fetges injectats amb pCpG/GK_{A456V} a llarg termini. A dia 53 post-injecció, es van obtenir biòpsies de fetge dels ratolins i van ésser analitzades en el respiròmetre d'alta resolució. **(A)** Es mostra el consum d'oxigen detectat en afegir antimicina-A (dades brutes). Les barres representen la mitjana ± l'error estàndard de les dades brutes. * p<0.05 determinat per One-Way ANOVA. **(B)** Es mostra el consum d'oxigen net detectat segons l'addició de substrats indicats a la base de la barra (parlem de consum net perquè se li ha restat el consum d'oxigen obtingut en presència d'antimicina-A). **(C)** La taula conté els valors de mitjana ± l'error estàndard dels càlculs

realitzats amb les dades de respirometria a les quals se'ls ha restat el consum d'oxigen amb Antimicina-A i s'han normalitzat per COX. ^Δ p<0.05 vs pCpG/GK, * p<0.05 vs Control i # p<0.01 vs pCpG/GK, determinat per One-Way ANOVA. N= 4, 12 i 10, respectivament. (C) *Western blot* representatiu del contingut proteic de VDAC.

Tal com es va realitzar en el *Capítol 1* d'aquest treball, vam avaluar el "leakage" (fugues d'electrons de la cadena respiratòria) de manera indirecta mitjançant la determinació dels mecanismes de defensa davant l'estrès oxidatiu que presentaven els fetges dels ratolins tractats amb pCpG/GK_{A456V}. Per una banda, vam estimar per *Western blot* la quantitat d'enzim superòxid dismutasa soluble (SOD-1) i mitocondrial (SOD-2), les quals s'acumulen en resposta a estrès oxidatiu. No observàrem diferències entre el grup pCpG/GK_{A456V} i el grup Control (Figura 69 A). Per l'altra, determinàrem el contingut de glutatió oxidat i reduït que presentaven i, de nou, no hi hagué diferències respecte el grup Control (Figura 69 B). Aquests resultats ens permeteren concloure que la sobreexpressió de GK_{A456V} al fetge durant un període prolongat de temps no s'acompanyava d'estrès oxidatiu.

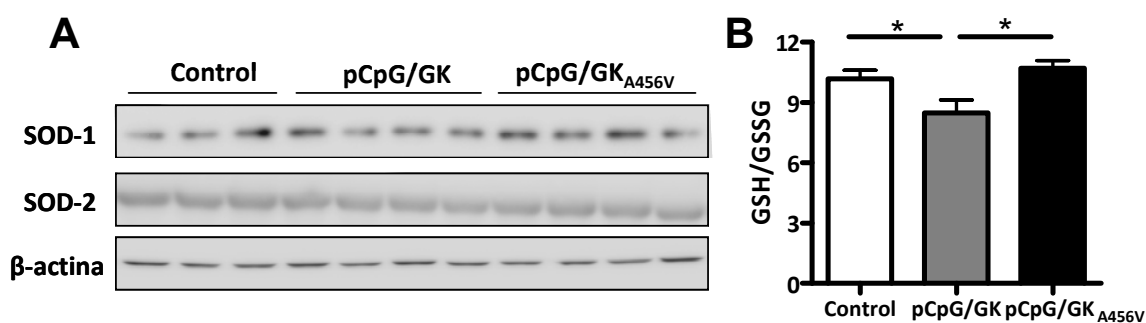


Figura 69. Avaluació d'estrès oxidatiu en els fetges dels ratolins injectats amb pCpG/GK_{A456V} a llarg termini. (A) El contingut cel·lular de la forma citosòlica (SOD-1) i mitocondrial (SOD-2) de la superòxid dismutasa va ésser determinat per *Western blot*. (B) També es van determinar els nivells de glutatió oxidat (GSSG) i reduït (GSH). El gràfic mostra la mitjana ± error estàndard del quocient GSH/GSSG (n= 5, 12 i 12 respectivament). * p<0.05 determinat per One-Way ANOVA.

La sobreexpressió prolongada de GK_{A456V} al fetge té conseqüències extrahepàtiques?

En aquest punt de l'estudi teníem diverses raons per considerar oportuna l'anàlisi sobre els efectes en el múscul i/o en el teixit adipós com a conseqüència de la sobreexpressió hepàtica de GK_{A456V}. Per una banda, disposàvem de dades d'un altre experiment de sobreexpressió a llarg termini amb pCpG/GK_{A456V} en el qual, a dia 18 post-injecció, els ratolins amb GK_{A456V} presentaven un perfil fisiològic diferent al grup control i al grup pCpG/GK. A la taula 25, es mostra com els animals del grup pCpG/GK_{A456V} ingerien més menjar, bevien més aigua i també presentaven una major quantitat de femta que els altres grups. Cal considerar també que l'estada en una gàbia metabòlica va suposar un estrès en l'animal que li ocasionà pèrdua de

pes (de l'ordre de 2 g en 24 hores), tot i que el grup que sobreexpressava la GK_{A456V} semblava tolerar millor els canvis.

	Control	pCpG/GK	pCpG/GK _{A456V}
Ingesta	0.775 ± 0.159	0.688 ± 0.121	1.407 ± 0.254 #
Beguda	2.326 ± 0.419	3.010 ± 0.696	4.115 ± 1.070 *
Orina	0.157 ± 0.046	0.157 ± 0.035	0.073 ± 0.013
Femta	0.392 ± 0.047	0.352 ± 0.034	0.631 ± 0.110 #
Δ de pes	-2.326 ± 0.190	-2.414 ± 0.195	-1.953 ± 0.196

Taula 25. Anàlisi de les funcions fisiològiques bàsiques dels ratolins que sobreexpressen la GK_{A456V} en el fetge. Divuit dies després de la injecció amb pCpG/GK_{A456V}, es van introduir els animals en gàbies metabòliques individualitzades durant 24 hores. Es van recollir i/o quantificar la ingesta, beguda, orina, femtes i pes. Les dades que es presenten a la taula són les mitjanes ± l'error estàndard. N=12. * p<0.05 vs Control i # p<0.05 vs Control i vs pCpG/GK, determinat per One-Way ANOVA.

Per altra banda, els resultats presentats al llarg d'aquest capítol demostraven que els efectes de la sobreexpressió de GK_{A456V} sobre el metabolisme hepàtic eren lleus (principalment una major captació de glucosa en un test de tolerància a glucosa, i la inducció de la glucosa-6-fosfatasa). Per tant, si ens centràvem només en les dades hepàtiques resultava difícil poder justificar el diferent patró fisiològic observat. Per aquest motiu intentàrem explorar els efectes a altres teixits importants en la homeòstasi de glucosa com són el múscul i el teixit adipós.

Pel què fa al **múscul esquelètic**, en primer lloc avaluàrem el contingut de glicogen el qual ens podia informar de la capacitat d'emmagatzematge de glucosa en aquest teixit. No detectàrem canvis significatius entre els grups experimentals (Control, 13.00 ± 1.87; pCpG/GK, 15.96 ± 1.13; pCpG/GK_{A456V}, 14.71 ± 1.23 mg glucosa/g múscul. N=5-12, no significatiu per One-Way ANOVA). Per tenir indicis del metabolisme energètic al múscul vam realitzar una anàlisi de proteïnes clau en la bioenergètica muscular, com l'AMPK, però no aconseguirem veure diferències entre els grups (Figura 70). Tampoc vàrem observar diferències significatives pel què fa al contingut de VDAC, SOD-1, SOD-2 (Figura 70).

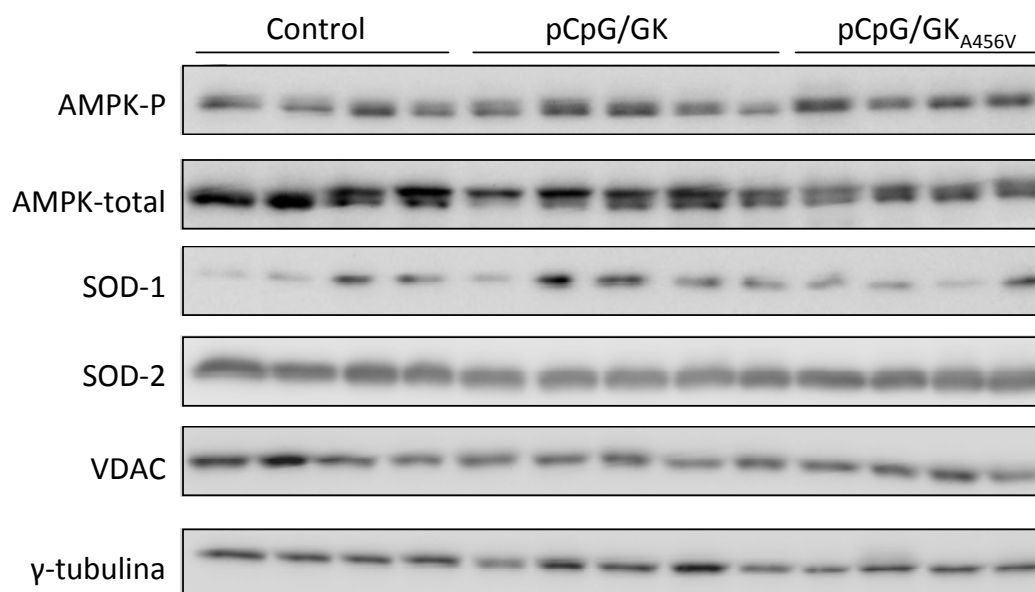


Figura 70. *Western blot* representatiu realitzat amb homogenats de múscul *Soleus* de ratolins BALB/c transfectats amb pCpG/GK_{A456V}.

Per avaluar els efectes indirectes de la sobreexpressió de GK_{A456V} al **teixit adipós**, primerament vam voler determinar si n'afectaria el contingut de TAG encara que no haguéssim observat variacions en el perfil lipídic sèric dels ratolins del grup pCpG/GK_{A456V}. En concordància vam detectar que els nivells de TAG no diferien entre el grup pCpG/GK_{A456V} i el control (897.4 ± 154.5 ; 797.6 ± 125.3 ; N= 12 i 5, respectivament). Una altra manera d'avaluar indirectament el grau d'adipositat que presentaven els ratolins fou mesurar els nivells de producció de leptina del teixit adipós. Amb aquesta finalitat vam obtenir extractes de teixit adipós i quantificàrem el contingut de leptina per ELISA. Els ratolins injectats amb pCpG/GK_{A456V} presentaren nivells de leptina similars als del grup Control (92.53 ± 13.44 pg/mg teixit al grup Control; 166.3 ± 29.01 , al grup pCpG/GK; 113.0 ± 16.07 . al grup pCpG/GK_{A456V}. N=5-12).

Seguint la mateixa línia, en realitzar un *Western blot* d'homogenats del teixit adipós no vam observar canvis entre els grups esmentats pel què fa al contingut de PPAR- γ (Figura 71), però sí una disminució dels nivells de PEPCK-C la qual cosa podria indicar una disminució de la gliceroneogènesi i, per tant, de la reesterificació de TAG però que no afectaria els nivells totals de lípids en el grup pCpG/GK_{A456V}. Per altra banda detectàrem un increment del contingut proteic de VDAC, fet que indicaria un increment del nombre de cadenes respiratòries. El resultat més sorprenent fou a l'hora de normalitzar per γ -tubulina, ja que vam detectar un increment del contingut d'aquesta proteïna en el grup pCpG/GK_{A456V}. Com que la γ -tubulina està associada als centròmers, aquest increment en el grup pCpG/GK_{A456V} podria indicar que hi ha un major nombre de cèl·lules per unitat de pes de teixit adipós respecte els altres grups

experimentals. Per corroborar-ho vam avaluar també els nivells de proteïna eIF-2 α , implicada en la transcripció i que acostuma a expressar-se de forma constant. També valoràrem el contingut d'una proteïna nuclear associada als cromosomes, com és el cas de la histona-H2A, ja que ens podria donar idea de si hi havia un major nombre de nuclis i així poder confirmar un major nombre de cèl·lules adiposes en aquest grup de ratolins que sobreexpressen la GK_{A456V} al fetge. En ambdós casos, eIF-2 α i histona-H2A, trobàrem un increment del senyal en el grup pCpG/GK_{A456V}. El contingut de β -actina es mantingué constant a tots els grups i l'usàrem de normalitzador (Figura 71). Conjuntament, aquests resultats permeteren concloure que la presència de la GK_{A456V} al fetge provoca canvis en l'estructura del teixit adipós, afavorint que hi hagi probablement més adipòcits i d'una mida més petita que en els altres grups experimentals, encara que la quantitat total de triglicèrids no es veu afectada. Hauria estat molt interessant poder realitzar un estudi histològic del teixit adipós per confirmar-ho, així com una anàlisi de les principals vies metabòliques relacionades amb la regulació de la grandària de l'adipòcit.

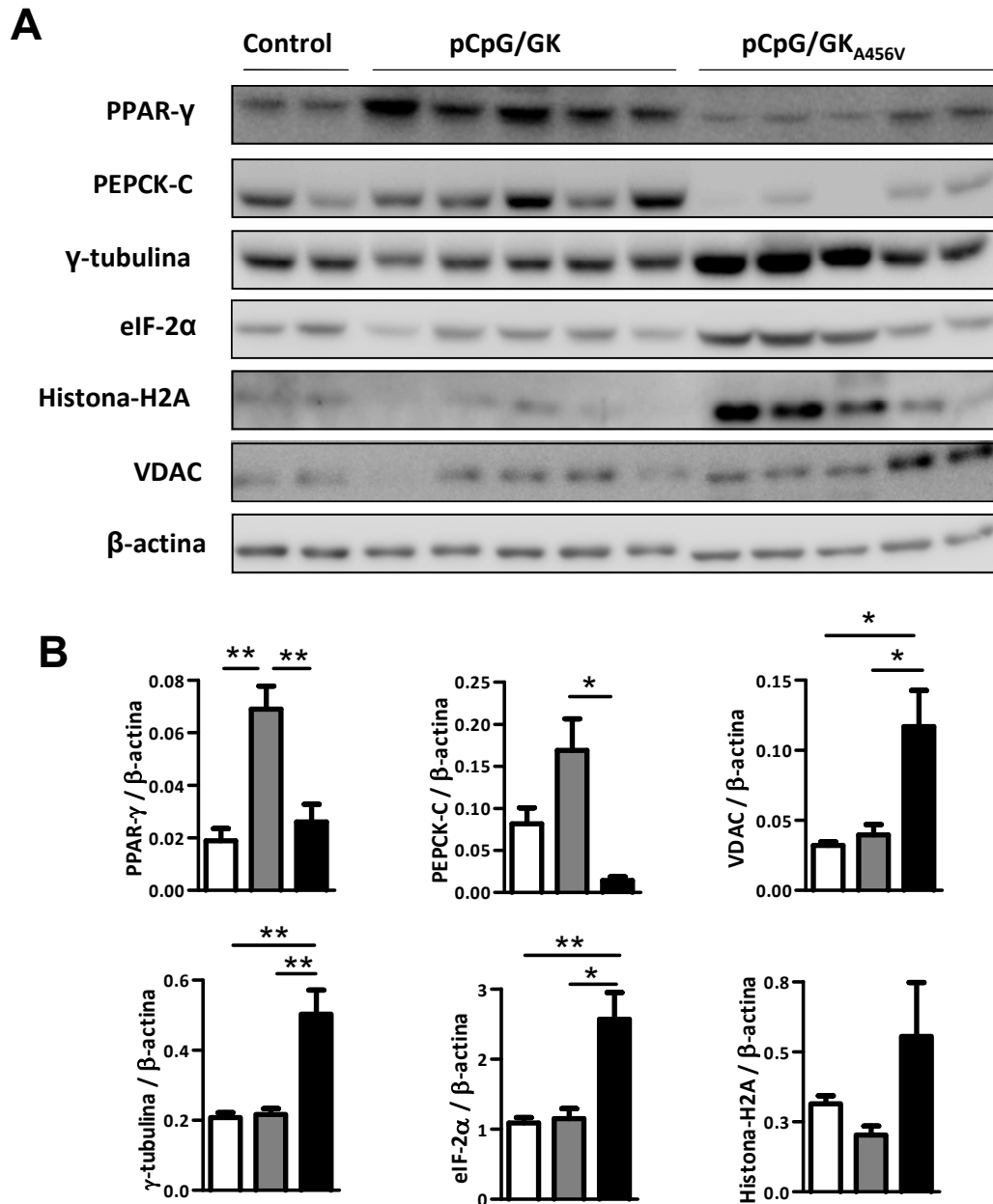


Figura 71. Anàlisi per *Western blot* del contingut de proteïnes implicades en lipogènesi i re-esterificació en el teixit adipós dels ratolins BALB/c transfectats amb pCpG/GK_{A456V}. (A) Es mostra una imatge representativa del *Western blot* realitzat amb homogenats del teixit adipós epididimal obtingut a 53 dies post-transfecció hidrodinàmica. (B) Les gràfiques representen la mitjana ± error estàndard de la quantificació densitomètrica relativa del *Western blot*, usant com a normalitzador la β-actina (serveix de control de càrrega del gel). En blanc es representa el grup Control; en gris, el grup pCpG/GK; en negre, el grup pCpG/GK_{A456V}. * p<0.05 i ** p<0.01, determinat per One-Way ANOVA.

A continuació ens centrarem en poder explicar com la sobreexpressió de GK_{A456V} al fetge podia afectar el metabolisme dels adipòcits. Ens interessarem per un seguit de proteïnes sintetitzades al fetge, secretades al torrent sanguini i que en els últims anys s'ha descrit que intervenen en el control de l'homeòstasi de glucosa gràcies a les seves accions als teixits perifèrics:

- **BMP-9** (*Bone morphogenetic protein-9*) fou el primer factor produït per les cèl·lules hepàtiques no parenquimals del qual es demostrà que disminuïa la concentració de glucosa mitjançant els seus efectes sobre la cèl·lula β , on activava la secreció d'insulina, sobre el múscul, on afectava la glicogen sintasa cinasa, i sobre el mateix fetge, on inhibia la producció hepàtica de glucosa i modulava l'expressió de FAS i de l'enzim màlic [418]. En estudis més recents, es concretà l'acció de BMP-9 com a agent sensibilitzador a la insulina [419]. Vam analitzar l'expressió BMP-9 per qRT-PCR al fetge dels ratolins que sobreexpressaven la GK_{A456V} i no detectàrem diferències significatives entre els grups experimentals (Figura 72).
- Una altra d'aquestes proteïnes és la **Fgf-21** (*Fibroblast growth factor 21*) la qual va ésser identificada el 2000 pel grup de Nishimura [420]. S'expressa majoritàriament al fetge i és un potent activador de la captació de glucosa als adipòcits ja que activa la transcripció del transportador de glucosa GLUT-1 el qual és independent d'insulina [421]. S'ha descrit que ratolins transgènics que sobreexpressen la Fgf-21 al fetge, a la llarga, presenten una disminució de la mida dels adipòcits del teixit adipós subcutani, conjuntament amb una millora de la *clearance* de glucosa i de la sensibilitat a insulina [421]. Per altra banda, existeixen estudis que demostren que la seva administració farmacològica protegeix de la obesitat induïda per una dieta rica en greixos i que, en models de diabetis de tipus 2, disminueix l'esteatosi hepàtica, augmenta la despesa energètica i millora la resistència a insulina [421, 422, Dostalova, 2009 #423]. Per tant, era una molècula interessant per avaluar en el nostre model experimental. En determinar els nivells de mRNA de *Fgf21* al fetge del grup injectat amb pCpG/GK_{A456V} no observàrem diferències significatives respecte els altres grups experimentals (Figura 72). Ara bé, cal tenir en compte que els ratolins del nostre experiment estaven alimentats i que l'expressió de Fgf-21 s'indueix en estats de dejuni [423]. De fet, recentment s'ha descrit que PPAR- α regula la transcripció de Fgf-21 i que la seva funció principal és adaptar l'organisme al dejuni mitjançant la posterior activació de PGC-1 α , l'activació de la cetogènesi al fetge i de la lipòlisi al teixit adipós blanc [423, 424]. Per tant, la mesura dels nivells de mRNA de Fgf-21 en ratolins dejunats hagués permès valorar el paper d'aquest factor en els efectes sobre els adipòcits.
- **IGFBP-2** (*IGF-binding protein 2*) és una de les IGFBPs circulants més abundant a l'organisme, tot i que el seu paper fisiològic no és encara conegut del tot. Ens interessà perquè existia un model de ratolí transgènic per IGFBP-2 el qual no esdevenia resistent a insulina ni desenvolupava obesitat en ésser sotmès a una dieta rica en greixos [425].

Per altra banda, els ratolins transgènics presentaven una disminució de la mida dels adipòcits, tant si seguien una dieta normal com rica en greixos. En el nostre model experimental, vam detectar per qRT-PCR que els ratolins del grup pCpG/ GK_{A456V} presentaven uns nivells semblants de mRNA de IGFBP-2 als del grup control i el grup pCpG/GK (Figura 72).

- La proteïna **RBP-4** (*Retinol-binding protein 4*) és un transportador sanguini de retinoids com la vitamina A. Es produeix majoritàriament al fetge, però també al teixit adipós [426]. Tant humans com ratolins amb resistència a insulina presenten nivells elevats de RBP-4 al sèrum, indicant que té un paper important en la homeòstasi de glucosa. En el fetge dels ratolins que sobreexpressen la GK_{A456V} no s'observaren canvis d'expressió de *Rbp-4* en comparació amb els altres grups (Figura 72).

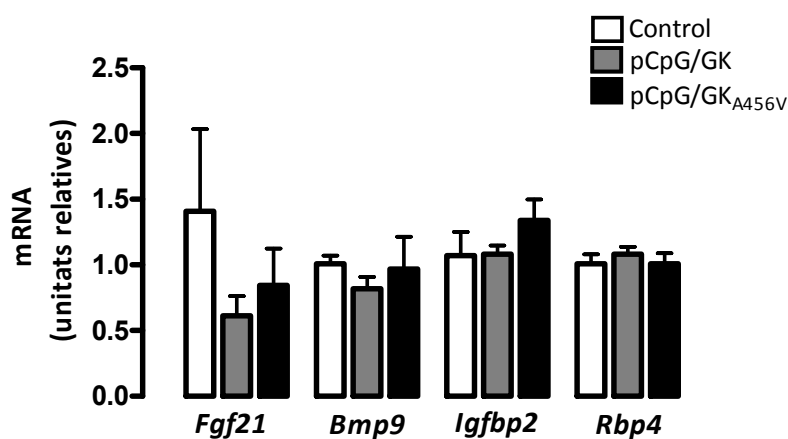


Figura 72. Avaluació dels nivells d'expressió al fetge de gens relacionats amb la senyalització inter-òrgans. Les barres representen la mitjana de cada grup relativa a la mitjana del grup control \pm l'error estàndard. Les dades es van analitzar fent el càlcul de $\Delta\Delta Ct$ (Applied Biosystems) utilitzant el gen de la $\beta 2$ -microglobulina com a normalitzador. No existeixen diferències significatives entre els grups, segons l'anàlisi per One-Way ANOVA (N=5-7).

Algunes de les proteïnes esmentades també són sintetitzades als adipòcits. Concretament, la RBP-4 va ésser definida com a adipocina ja que estava induïda en un model de *knockout* de GLUT-4 al teixit adipós que presentava un fenotip de resistència sistèmica a insulina [426]. També es demostrà que la disminució dels nivells sanguinis de RBP-4 millorava la resistència a insulina. Per aquests motius considerarem oportú mesurar els nivells d'expressió de *Rbp4* en el teixit adipós. Tal i com es pot observar en la figura 73, la sobreexpressió de GK_{A456V} al fetge ocasionà una disminució significativa del contingut de mRNA de *Rbp4* al teixit adipós epididimal.

Per altra banda, la IGFBP-2 també es demostrà que s'expressa al teixit adipós [425]. Com ja s'ha esmentat anteriorment, el ratolí transgènic per IGFBP-2, que també tenia incrementats els

nivells d'expressió de IGFBP-2 al teixit adipós, presentava una disminució de la mida dels adipòcits. Possiblement aquest fenotip era resultat de l'acció inhibidora de IGFBP-2 sobre l'acumulació de TAG intracel·lulars o com a resultat de l'acció inhibidora de IGFBP-2 sobre l'adipogènesi mitjançada per IGF-1. En mesurar el grau d'expressió de *Igfbp2* al teixit adipós epididimal vam observar un augment no significatiu en el grup injectat amb pCpG/GK_{A456V} (Figura 73 A); així com també s'observà la mateixa tendència en els nivells sèrics de la proteïna IGFBP-2 (Figura 73 C).

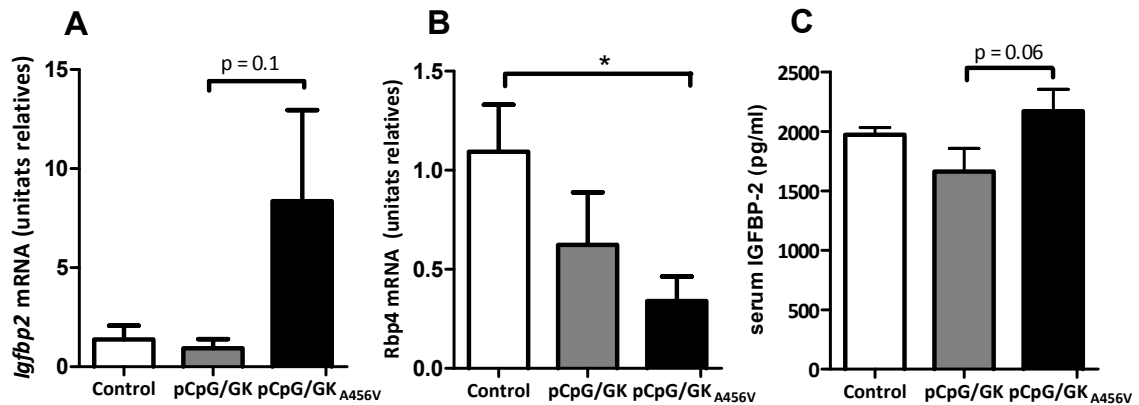


Figura 73. Avaluació de la senyalització inter-òrgan. (A i B) Les barres dels gràfics de mRNA representen la mitjana de cada grup relativa a la mitjana del grup control \pm l'error estàndard; les dades es van analitzar fent el càlcul de $\Delta\Delta Ct$ (Applied Biosystems) utilitzant el gen de la $\beta 2$ -microglobulina com a normalitzador. N=4. **(C)** Les barres representen la mitjana de cada grup \pm l'error estàndard, referent als nivells sèrics de IGFBP-2 N=6. * $p < 0.05$, determinat per One-Way ANOVA.

En conjunt, podríem concloure que els ratolins que sobreexpressaven la GK_{A456V} al fetge durant 53 dies presentaven canvis evidents en el teixit adipós, probablement com a conseqüència de la variació d'expressió d'altres factors implicats en la comunicació inter-òrgans.

DISCUSSIÓ

Tant el capítol 1 d'aquesta tesi com altres estudis han permès concloure que la sobreexpressió de la GK al fetge no seria una teràpia efectiva per a la diabetis, a causa de les conseqüències deletèries que té sobre el metabolisme lipídic [116, 117, 270, 354, 355]. No obstant, aquests treballs corroboraven el paper clau que té l'activitat GK hepàtica sobre l'homeòstasi glucídica i lipídica de l'organisme. Coetàniament a aquests estudis de sobreexpressió de GK, algunes companyies farmacèutiques han desenvolupat diverses molècules sintètiques amb funció activadora de la GK (GKAs) [137, 180, 357]. Els GKAs provoquen una millora del fenotip diabètic (augment de la insulinèmia i disminució de la glicèmia) en models de diabetis tipus 2, inclòs en assajos clínics en humans, gràcies majoritàriament al seu efecte insulina-secretagog a la cèl·lula β pancreàtica. No obstant, l'acció neta que realitzen els GKAs sobre les altres cèl·lules que també expressen GK (hepatòcits, cèl·lules L de l'intestí i cèl·lules neuroendocrines de l'hipotàlem) no està definida.

Amb aquests antecedents, vam plantejar-nos usar el nostre model d'injecció hidrodinàmica de DNA nuu per introduir al fetge una forma mutant de la GK, la GK_{A456V}. La GK_{A456V} fou descrita en humans que patien PHHI i, com totes les mutacions activadores, confereix a l'enzim les mateixes propietats que la unió dels GKAs. Al nostre laboratori, disposàvem del gen de la GK de rata al qual introduírem la mutació A456V per mutagènesi dirigida. A continuació vam demostrar que la GK_{A456V} de rata obtinguda presentava una major afinitat per a la glucosa que la GK silvestre, tal com succeïa amb la GK_{A456V} humana. Aquest fet es deu a l'elevada conservació de seqüència que presenta la GK pel fet d'ésser un enzim important en el metabolisme de glucosa.

A part de les diferències cinètiques entre la GK silvestre i la GK_{A456V}, l'estudi de Kamata en què publicava les bases estructurals de la regulació al·lostèrica de la GK va plantejar-nos la possibilitat que la GK_{A456V} podria ésser regulada de manera diferent a nivell d'interaccions proteiques [136]. El seu treball demostrava que la mutació A456V, com les altres mutacions activadores, resideix en una regió mòbil de l'enzim que és responsable de canvis conformacionals. Les mutacions activadores, així com la unió dels GKAs, determinen que l'enzim presenti constantment una conformació tancada en lloc de l'alternança entre la conformació tancada, oberta i super-oberta. Concretament, vam decidir avaluar si la conformació tancada de la GK_{A456V} podria afectar la interacció amb la GKRP, la qual és clau per a la localització nuclear de la GK a l'hepatòcit. Per aquest motiu vam emprar un model de cultiu primari d'hepatòcits de rata amb diabetis tipus 1 induïda per STZ al qual transfectàrem

plasmidis amb els gens de la GK_{A456V} i de la GGRP. Si ambdues proteïnes s'unien, detectaríem senyal de GK_{A456V} al nucli a baixes concentracions de glucosa mitjançant immunocitoquímica, seguint el protocol proposat pel grup de Agius *et al* [195]. Vam transfectar també plasmidis amb la GK silvestre com a control del sistema. Aquest model ens garantia que a l'hepatòcit hi hauria tota la maquinària necessària per a l'entrada de la GK al nucli, el mecanisme de la qual encara es desconeix. Per altra banda, el fet d'usar hepatòcits diabètics ens assegurava que no hi hauria interferències de la GK endògena. Aquests experiments ens vam permetre demostrar que la GK_{A456V} estava majoritàriament al citosòl dels hepatòcits, independentment de la concentració de glucosa al medi i de la presència de la GGRP. Per tant, poguérem concloure que la GK_{A456V} no interacciona amb la GGRP. En el transcurs d'aquest treball aparegueren diferents estudis tant amb la mateixa GK_{A456V} [262, 427], com amb GKAs [180, 200] que corroboraven la conclusió que l'activació de la GK afecta la regulació per GGRP.

Havent determinat que la GK_{A456V} era un enzim amb més afinitat per a la glucosa i amb una regulació diferent que la GK silvestre, resultava interessant avaluar si la sobreexpressió de GK_{A456V} al fetge tindria uns efectes diferents als observats en la sobreexpressió de la GK silvestre. En primer lloc vam avaluar l'expressió de GK_{A456V} en el context d'un animal sa. Vam injectar hidrodinàmicament ratolins de la soca ICR els quals van ésser estudiats a curt termini (1-18 dies) i ratolins de la soca Balb/c per a un estudi a més llarg termini (53 dies). En ambdós models la presència de la GK_{A456V} al fetge comportava una disminució significativa de la glicèmia en comparació amb els animals controls. Cal destacar que en cap cas, ni en alimentació ni en dejuni, s'assoliren estats d'hipoglicèmia com a conseqüència de la sobreexpressió de GK_{A456V}, la qual cosa resulta molt interessant perquè és un dels riscos i/o problemes que genera l'administració sistèmica dels GKAs [137, 144, 361]. Per altra banda, existeix un model de ratolí transgènic que expressa la GK_{A456V} sota el control endogen de la GK (s'expressa a fetge, pàncrees, hipotàlam) i es caracteritza per un fenotip hipoglicèmic com a conseqüència d'una major secreció d'insulina, encara que sigui més lleu que l'observat en els pacients de PHHI [427]. En conjunt podem concloure que l'activació de la GK exclusivament al fetge no indueix hipoglicèmia encara que pot provocar una disminució moderada de la glicèmia sobretot en estats d'alimentació.

Com a conseqüència de la reducció de la glucosa en sang, observarem una davallada significativa dels nivells d'insulinèmia en estat d'alimentació en comparació amb els animals control, però del mateix ordre que l'observada en el grup que sobreexpressava la GK silvestre. En el transcurs de l'experiment a llarg termini, el grup de ratolins injectats amb pCpG/GK_{A456V} acabà tenint el mateix patró de glicèmia i d'insulinèmia que el grup control. Una possible explicació podria ésser que els efectes sobre aquests paràmetres fossin dosi-dependents i, com

que els nivells d'expressió del transgen decreixen amb el pas del temps, anessin atenuant-se. Una altra possibilitat seria que l'organisme generés mecanismes d'adaptació a l'expressió de la GK_{A456V} al llarg d'aquest període.

Les diferències més evidents entre els grups experimentals s'observaren en un test de tolerància a glucosa, tant en els ratolins ICR com en els Balb/c. La sobreexpressió de GK_{A456V} al fetge generava una reducció del pic de glicèmia als 30 minuts post-injecció, la qual cosa denotava una major capacitat d'extracció de la glucosa de la sang. Per altra banda, el grup pCpG/GK_{A456V} també presentava un patró de comportament fisiològic diferent en ésser sotmès a 24 h d'estada en gàbies metabòliques.

Efectes hepàtics de la sobreexpressió de GK_{A456V}

D'entrada hom esperaria poder explicar les conseqüències fisiològiques descrites en el grup pCpG/GK_{A456V} per un increment del metabolisme de glucosa en el fetge dels ratolins. Sorprenentment, en avaluar els nivells de metabòlits hepàtics marcadors de metabolisme de glucosa (glucosa-6P, glicogen, lactat) no detectàrem canvis respecte el grup control. En la mateixa línia, l'expressió de gens i proteïnes implicats en la glicòlisi es mantenia inalterada. Cal considerar que les mesures es van realitzar en els fetges dels animals sacrificats en situació d'alimentació, en un estat estacionari. Potser, si s'hagués realitzat l'anàlisi en situació de realimentació o bé després d'un *clamp* haguéssim pogut obtenir resultats diferents sobre el metabolisme de glucosa. En aquesta línia, si ens centrem en els nivells hepàtics de glicogen, existeix un estudi amb un GKA (PSN-GK1) de la companyia Prosidon que avalua els nivells de glicogen en ratolins *ob/ob* després de 9 dies de tractament i no en detecten canvis respecte el grup control. Cal tenir en compte que la majoria d'estudis amb GKAs que conclouen que aquestes molècules indueixen un augment del glicogen hepàtic es basen en experiments de clampatge i en hepatòcits aïllats [137, 180, 357]. Per tant, podríem concloure que l'activació de la GK al fetge no afectaria el metabolisme glucídic en un estat estacionari.

En avaluar indirectament la via gluconeogènica mitjançant la determinació dels nivells de mRNA dels principals efectors gluconeogènics no vam observar canvis significatius respecte el grup control, com s'espera en una situació d'alimentació en què la gluconeogènesi no està activada. Un cas excepcional fou la glucosa-6-fosfatasa, típicament reconeguda com a l'últim enzim de la via gluconeogènica, la qual presentava uns nivells de mRNA i també de proteïna significativament elevats en el grup pCpG/GK_{A456V}. Aquesta inducció de proteïna glucosa-6-fosfatasa podria suposar l'existència d'un cicle fútil entre la glucosa-6-fosfat (generada per l'activitat GK_{A456V}) i la glucosa (generada per l'activitat glucosa-6-fosfatasa), conegut amb el nom de cicle de glucosa, el qual provocaria que no hi hagués increment de la concentració

hepàtica de glucosa-6P. Com que la glucosa-6P és clau per a la glicòlisi i regula la síntesi de glicogen, el fet que no s'acumuli podria ésser responsable de la manca d'inducció glicolítica i del manteniment dels nivells de glicogen (sense que augmentin respecte el control) que vam observar en els fetges dels ratolins que expressaven la GK_{A456V}.

D'especial interès era avaluar l'impacte de l'activació de la GK al fetge sobre el metabolisme lipídic. Curiosament, la majoria dels estudis publicats sobre els efectes dels GKAs *in vivo* no mostren perfil lipídic dels animals [137, 357]. Aquest fet crida l'atenció perquè els estudis de sobreexpressió hepàtica de GK vinculaven l'augment de l'activitat GK a la dislipidèmia i acumulació de lípids al fetge [116, 117, 270, 354, 355], i, per tant, podria ésser una de les limitacions que podrien presentar aquests fàrmacs de cara a la seva acció terapèutica per a la diabetis. En el nostre model experimental, la presència de la GK_{A456V} al fetge no produí cap alteració significativa dels lípids sèrics ni hepàtics. Aquest resultat podria ésser previsible si tenim en compte que no es detectaren alteracions en la lipèmia dels malalts de PHHI deguda a la mutació A456V, ni en el model de ratolins transgènics *gk*^{A456V/W} o *gk*^{A456V/A456V}, ni en els ratolins *ob/ob* tractats amb el GKA PSN-GK1 [247, 248, 358, 427]. De fet, la família en què es va descriure la mutació A456V presenta una gran variabilitat de fenotip, possiblement perquè hi ha altres factors ambientals i genètics que hi influeixen. Però cap dels portadors de la mutació presentava un perfil lipídic advers, a part d'un dels afectats a qui li augmentaven lleugerament els triglicèrids sèrics en dejuni. Curiosament, recentment s'ha associat un polimorfisme de nucleòtid únic (SNP *single nucleotide polymorphism*) a la GKRP (L446P) amb un increment dels nivells de TAG sèrics i una disminució de la glicèmia en dejuni [211, 428, 429]; per altra banda, aquest polimorfisme també està associat a una menor incidència de la diabetis de tipus 2 [428]. S'ha especulat que aquesta mutació en la GKRP, produeix una baixa inhibició de la GK i, en conseqüència, incrementaria l'activitat GK que comportaria un augment del metabolisme de glucosa i de la biosíntesi lipídica [430]. En conjunt, malgrat que existeixin molts indicis que l'activació de la GK no té efectes deleteris sobre el metabolisme lipídic, caldria realitzar més estudis en estat de dejuni per assegurar-ne la seguretat de cara a un ús terapèutic.

En avaluar la funció mitocondrial dels fetges que sobreexpressaven la GK_{A456V} vam detectar una disminució de la respiració al Complex II tot i que no s'afectaven els nivells d'ATP intracel·lulars. El complex II també s'anomena succinat deshidrogenasa (SDH) i, a més de pertànyer a la cadena respirtòria, pertany al cicle de Krebs. En realitat, es tracta de l'únic enzim del cicle de Krebs associat a la membrana mitocondrial, i catalitza la reacció reversible entre succinat i fumarat. La SDH pot ésser regulada a nivell transcripcional per PGC-1 α , NRF1 i/o lipina [431, 432]. La lipina és un enzim involucrat en el metabolisme dels TAG i un regulador transcripcional que coactiva el complex hepàtic PGC-1 α /PPAR- α per incrementar el

catabolisme d'àcids grassos. Els animals que expressaven GK_{A456V} no tenien disminuïda l'expressió de PGC-1 α ni la de PPAR- α . La SDH també pot regular-se per acetilació [433], i per diversos activadors i inhibidors. Exemples d'inhibidors són: l'oxalacetat [434], que exerciria un paper protector minimitzant la producció de superòxid; el malonat, que prové del malonil-CoA i del dialdehid malònic (ambdós són resultat de la degradació de lípids o de la peroxidació lipídica, respectivament). Per altra banda, s'ha descrit una correlació entre una disminució de l'ús d'aminoàcids i una disminució de SDH [435].

Una dada anecdòtica és la disminució dels nivells d'urea que presenten els ratolins del grup injectat amb pCpG/GK_{A456V}. Malgrat que no sabríem donar-li una explicació fisiològica, recentment ha aparegut un treball en què es relaciona l'activitat de la glucosa-6-fosfatasa amb alteracions del cicle de la urea [436]. Cal considerar que la glucosa-6-fosfatasa pot tenir una activitat fosforiladora en què empra el carbamil-fosfat (intermediari del cicle de la urea) com a donador del grup fosfat. Per tant, l'increment de l'activitat fosfotransferasa de la glucosa-6-fosfatasa podria produir una disminució del carbamil-fosfat disponible per al cicle de la urea. Altrament, la disminució dels nivells d'urea podria ésser degut a una disminució del catabolisme d'aminoàcids. Aquest fet podria vincular-se amb l'esmentada disminució de l'activitat SDH. Per tant, seria interessant avaluar el metabolisme aminoacídic hepàtic d'aquests animals en projectes posteriors.

Efectes extrahepàtics de la sobreexpressió de GK_{A456V}

La sobreexpressió de GK_{A456V} tingué aparentment conseqüències lleus sobre el metabolisme hepàtic, però va generar alteracions estructurals del teixit adipós. Concretament, no detectàrem diferències evidents del grau d'adipositat ja que ni els nivells de TAG al teixit adipós epididimal ni l'expressió de leptina diferiren respecte el grup control. Ara bé, mitjançant l'anàlisi per *Western blot* poguérem deduir que el teixit adipós epididimal dels ratolins del grup pCpG/GK_{A456V} contenia un major número de cèl·lules per unitat de pes. Aquest fenomen conegut com a hiperplàsia també s'ha observat en models d'animals sans i de diabetis de tipus 2 que han estat tractats amb TZDs [437-440]. Les TZDs són agonistes de PPAR- γ el qual és un factor de transcripció determinant per a la diferenciació dels pre-adipòcits en adipòcits. En comparació amb els pre-adipòcits, els adipòcits tenen una major capacitat per a la captació d'àcids grassos i són potencialment més sensibles a la insulina ja que tenen un major nombre de transportadors de glucosa i de receptors d'insulina [441]. Per altra banda el tractament amb TZDs també indueix les vies d'oxidació d'àcids grassos, el cicle de Krebs i la fosforilació oxidativa, conjuntament amb una inhibició de la via lipogènica al teixit adipós. A més a més, tots aquests canvis en l'adipòcit afecten el patró de secreció d'adipocines, la qual cosa implica

un mecanisme general de redistribució energètica que promou una millora del fenotip diabètic.

Sigui via activació de PPAR- γ o per algun altre mecanisme, el teixit adipós dels ratolins del grup pCpG/GK_{A456V} presentà un increment de proteïnes mitocondrials, com VDAC, la qual cosa seria compatible amb la inducció de la biogènesi mitocondrial i l'augment de cadenes respiratòres que s'observa amb el tractament amb TZDs [442]. Per altra banda, en situació d'alimentació (en presència d'insulina), la disminució que vam detectar en els nivells de PEPCK-C també indicaria una disminució de la re-esterificació de TAG al teixit adipós, és a dir, podria suggerir que els adipòcits d'aquests animals tenen més activitat catabòlica que no pas anabòlica, com també succeeix amb el tractament amb TZDs [440].

A part dels estudis realitzats amb TZDs, existeixen diversos treballs on demostren que el fet de tenir adipòcits de mida més petita suposa una avantatge metabòlica de cara a desenvolupar resistència a insulina [438, 439, 443]. El creixement del teixit adipós a base d'incrementar la mida dels adipòcits i les vacuoles lipídiques que contenen està associat amb resistència a insulina. En canvi, els individus que expandeixen el seu teixit adipós via l'augment del nombre d'adipòcits - a través d'una resposta hiperplàsica - romanen sensibles a insulina i més saludables. Per tant, els canvis hiperplàsics del teixit adipós tenen l'avantatge de retenir la sensibilitat a insulina i a més de mantenir un patró de secreció d'adipocines favorable.

En el cas dels ratolins que sobreexpressaven la GK_{A456V} al fetge, detectarem una disminució de la producció de l'adipocina RBP-4 i un increment dels nivells de IGFBP-2 al teixit adipós. Malgrat que seria interessant avaluar altres adipocines més conegudes (adiponectina, resistina, TNF- α ...), aquest patró observat podria ésser considerat beneficiós i "anti-diabetogènic" ja que RBP-4 està elevada en casos de resistència a insulina [426, 444] i IGFBP-2, en canvi, disminuïda [425]. Com ja s'ha esmentat anteriorment, existeix un ratolí transgènic amb nivells elevats d'expressió de IGFBP-2 al teixit adipós que presentava una disminució de la mida dels adipòcits [425]. Aquest increment en IGFBP-2 també podria ésser una causa de la hiperplàsia observada en el nostre model experimental.

Importància de la comunicació inter-òrgans

Els nostres resultats reforcen el concepte que el teixit adipós i el fetge estan íntimament interconnectats, de manera que canvis en l'un generen canvis en l'altre. La comunicació entre els diferents teixits és clau per al manteniment de l'homeòstasi i pot estar exercida per diversos efectors: hormones, citocines i substrats energètics. Vist que la sobreexpressió de GK_{A456V} al fetge no generava canvis en els nivells sanguinis de marcadors metabòlics clàssics que afecten diversos teixits (insulina, leptina, la mateixa glucosa, àcids grassos), vam analitzar

l'expressió d'una sèrie de proteïnes de secreció sintetitzades al fetge i vinculades recentment al control de l'homeòstasi de glucosa (BMP-9, FGF-21, RBP-4, IGFBP-2) [418-421, 422, Dostalova, 2009 #423, 423, 425, 426, 445]. La sobreexpressió de GK_{A456V} no modificà el patró d'expressió de cap d'aquestes proteïnes.

Potser la comunicació entre fetge i teixit adipós pot ésser mitjançada per algun lípid produït als hepatòcits. Un exemple del paper dels lípids en la comunicació entre els òrgans és l'estudi de Cao et al., en què un lípid com el palmitoleat produït al teixit adipós pot actuar d'hormona i afectar el metabolisme del múscul i del fetge [446].

En conclusió, la sobreexpressió de GK_{A456V} en ratolins no genera efectes deleteris sobre l'homeòstasi de l'organisme, sinó que es pot suggerir que genera un fenotip anti-diabetogènic ja que:

- es manté la glicèmia i la insulinèmia en el rang normal, sense risc d'hipoglicèmies
- no genera alteracions en els nivells de lípids sèrics
- no indueix acumulació de lípids al fetge
- activa l'expressió de IGFBP-2 i inhibeix l'expressió de RBP-4 al teixit adipós
- genera hiperplàsia del teixit adipós

3. SOBREXPRESSIÓ DE GK_{A456V} AL FETGE PERIVENÓS DE RATOLINS AMB DIABETIS TIPUS 1

Els resultats presentats en el primer capítol reforcen la idea que la sobreexpressió de GK al fetge no és una bona estratègia terapèutica per a la diabetis. Per una banda vam demostrar que induïa resistència a insulina en animals sans. Per l'altra, en un model de diabetis tipus 1 no permetia assolir una correcció de la hiperglicèmia diabètica amb l'agreujant que afavoria la dislipidèmia. Després d'haver observat que la sobreexpressió a llarg termini de la GK_{A456V} al fetge perivenós no generava resistència a insulina ni cap alteració que semblés predisposar a un estat patològic, vam considerar oportú prosseguir amb l'objectiu d'avaluar indirectament les conseqüències de l'activació de la GK al fetge com a teràpia potencial de la diabetis. Emprarem el model d'injecció hidrodinàmica de pGK_{A456V} en ratolins amb diabetis de tipus 1 induïda per STZ.

En primer lloc vam realitzar una sèrie d'experiments preliminars en què vam administrar diferents dosis de pGK_{A456V} a ratolins amb diabetis tipus 1 induïda per STZ. Ens van permetre demostrar que la sobreexpressió de pGK_{A456V} tenia millors efectes sobre la glicèmia en dejuni que la sobreexpressió de pGK. No obstant l'efecte sobre la glicèmia no es mantenia en el temps probablement per pèrdua o silenciament del plasmidi d'expressió. Vam escollir la dosi elevada ja que permetia assolir un major efecte sobre la glicèmia, cosa desitjada de cara a una possible teràpia de la diabetis (Figura 74)

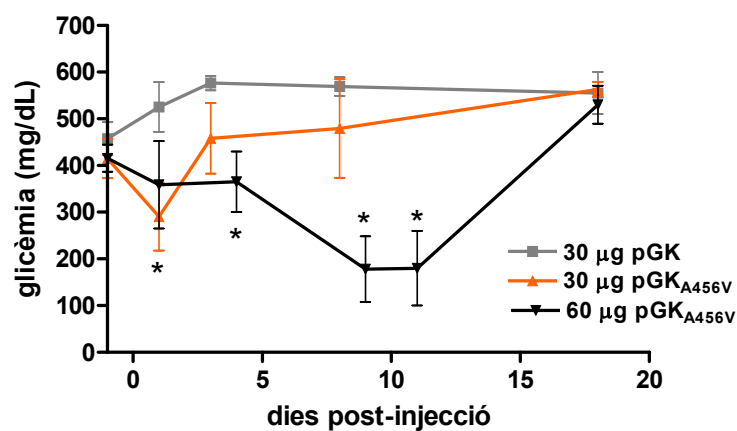


Figura 74. Seguiment de la glicèmia després de 6 h de dejuni en animals diabètics injectats amb pGK_{A456V}. Es presenten la mitjana \pm l'error estàndard de les dades de glicèmia. N=5. * $p < 0.05$ determinat per One-way ANOVA.

Per aprofundir en l'estudi dels mecanismes implicats en aquesta baixada de glicèmia vam analitzar la transfecció de pGK_{A456V} en els fetges diabètics dos dies post-injecció, havent escollit la dosi de 60 µg la qual permetia un major efecte hipoglicèmic, seguint el protocol indicat a la Figura 75.

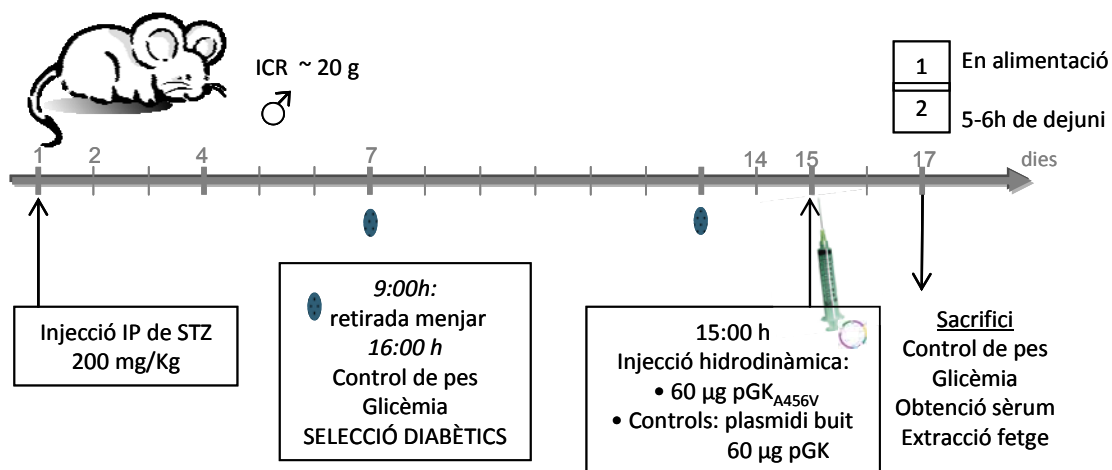


Figura 75. Protocol experimental de sobreexpressió de pGK en el fetge de ratolins amb diabetis tipus 1 induïda experimentalment amb STZ.

Sobreexpressió de pGK_{A456V} al fetge de ratolins amb diabetis tipus 1 induïda per STZ.

A l'hora de poder comparar els resultats obtinguts amb la injecció pGK_{A456V} amb els resultats detallats a l'apartat 2 del primer capítol d'aquesta tesi, vam haver d'assegurar que els nivells de transaminases resultat de la injecció hidrodinàmica fossin del mateix ordre (pControl 207.5 ± 29.88 U/L, pGK 121.0 ± 48.43 U/L, pGK_{A456V} 117.5 ± 40.35 U/L; n=4-9), per evitar fer comparacions entre efectes del transgen i efectes de lesió hepàtica. Per altra banda, també fou molt important garantir que la sobreexpressió de GK i de GK_{A456V} eren similars en els dos grups experimentals. Tal i com s'indica a la figura 76 A, vam avaluar els nivells d'expressió del mRNA de *Gck* de rata mitjançant qRT-PCR. Aquesta determinació ens va permetre seleccionar els animals per a l'estudi, de manera que el grup injectat amb pGK i el grup injectat amb pGK_{A445V} presentessin nivells similars de transgen. Pel què fa al contingut proteic, vam detectar per *Western blot* que els homogenats dels fetges transfectats amb pGK i els dels fetges transfectats amb pGK_{A456V} contenien nivells similars de proteïna GK (Figura 76 C). En determinar l'activitat GK dels homogenats hepàtics, els dos grups que expressaven GK tenien uns valors d'activitat GK similars a 100 mM de glucosa; però, a 5 mM de glucosa, el grup injectat amb pGK_{A456V} tenia major activitat GK que el grup pGK, segurament a causa de la major afinitat per a la glucosa que confereix la mutació A456V (Figura 76 B).

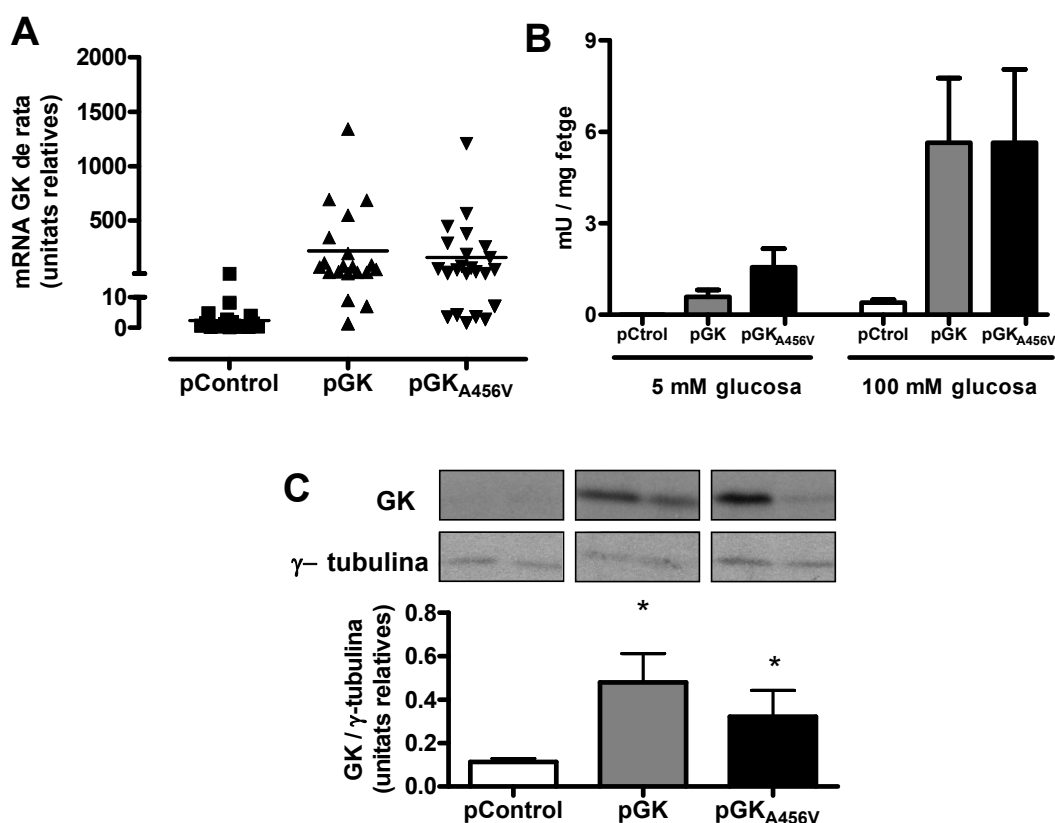


Figura 76 Avaluació del nivell de sobreexpressió de pGK_{A456V} en el fetge de ratolins amb diabetis tipus 1 induïda amb STZ. A les 48 hores post-injecció, els ratolins van ésser sacrificats i es va analitzar el nivell d'expressió del transgen al fetge per qRT-PCR, amb encebadors específics pel mRNA de la GK de rata. Els resultats van ésser normalitzats amb β 2-microglobulina i expressats en relació al grup control (A). També es van obtenir extractes de fetge i se'n va determinar l'activitat GK a 5 mM i a 100 mM de glucosa (B) i també es van resoldre els homogenats de fetge per *Western blot* (C) on el panell superior mostra un Western representatiu i el panell inferior, l'anàlisi densitomètrica del Western blot.

Impacte de la sobreexpressió de pGK_{A456V} en el fetge perivenós d'animals diabètics alimentats

La presència de la proteïna GK_{A456V} en el fetge es tradueix en una disminució lleugera però significativa de la hiperglicèmia diabètica (Taula 26), del mateix ordre que la disminució assolida en els animals injectats amb pGK. De la mateixa manera, no es van observar canvis significatius en els altres paràmetres sèrics.

	pControl	pGK	pGK _{A456V}
glucosa (mg/dL)	892.6 ± 63.20	759.7 ± 48.38 *	732.0 ± 37.93 *
lactat (mM)	13.47 ± 1.839	13.02 ± 1.484	12.74 ± 1.493
AGL (mM)	0.947 ± 0.082	0.881 ± 0.069	1.015 ± 0.093
TAG (mg/dL)	177.3 ± 23.54	134.6 ± 16.06	173.6 ± 24.65
β-hidroxibutirat (mM)	0.144 ± 0.028	0.106 ± 0.021	0.104 ± 0.025
Insulina (μg/L)	< 0.08	< 0.08	< 0.08

Taula 26. Determinació dels paràmetres sèrics dels ratolins diabètics injectats amb pGK_{A456V} i pGK, i analitzats 48h post-injecció en estat d'alimentació. Els valors representen la mitjana \pm error estàndard de cada grup. n= 12, 7 i 8, respectivament * p<0.05, determinat per t-Student.

Per avaluar si la disminució de glicèmia es corresponia amb un augment de metabolisme i emmagatzematge de glucosa al fetge, com a conseqüència de l'activitat GK exògena, vam avaluar els nivells de diversos metabòlits hepàtics (Taula 27). Cal destacar l'increment significatiu del contingut de glicogen hepàtic que presenten els animals injectats amb pGK_{A456V} en comparació amb els animals control, però de la mateixa magnitud que el glicogen del grup pGK. Els nivells lleugerament incrementats de fructosa-2,6-bisfosfat, conjuntament amb el lleu augment de lactat hepàtic que presenten els fetges dels animals injectats amb pGK_{A456V}, hi indicarien un increment del flux glicolític.

	pControl	pGK	pGK _{A456V}
Glicogen (mg glc / g fetge)	27.01 ± 2.275	35.62 ± 2.06 *	38.29 ± 3.40 *
Glc (µmol/g fetge)	40.70 ± 5.921	32.72 ± 1.475	47.68 ± 7.328
G6P(µmol/g liver)	0.16 ± 0.021	0.14 ± 0.018	0.15 ± 0.021
F2,6BP (nmol/g liver)	1.19 ± 0.215	2.84 ± 0.625 *	1.90 ± 0.517
Lactate (µmol/g)	1.31 ± 0.275	1.78 ± 0.424	2.27 ± 0.951
TAG (mg/g)	6.25 ± 0.26	6.08 ± 0.36	6.26 ± 0.17
AMP (µmol/g)	1.05 ± 0.054	1.01 ± 0.084	1.01 ± 0.064
ADP (µmol/g)	1.03 ± 0.134	1.12 ± 0.09	1.06 ± 0.174
ATP (µmol/g)	0.67 ± 0.148	0.66 ± 0.065	0.74 ± 0.172
GSH/GSSG ratio	11.73 ± 0.87	11.81 ± 0.93	11.37 ± 0.87

Taula 27 Determinació dels metabòlits hepàtics indicats, dels ratolins diabètics injectats amb pGK_{A456V} i pGK, analitzats 48h post-injecció en estat d'alimentació. Els valors representen la mitjana ± error estàndard de cada grup. n= 12, 7 i 8, respectivament. Glc, significa glucosa lliure; G6P, glucosa-6-fosfat; F2,6BP, fructosa-2,6-bisfosfat. * p<0.05, determinat per one-way ANOVA.

Tot i que es va detectar cert metabolisme de glucosa en els fetges dels ratolins injectats amb pGK_{A456V}, no vam observar variacions significatives en els nivells de proteïna PEPCK-C en comparació amb els animals del grup pControl. Tampoc vam poder detectar diferències significatives entre els tres grups experimentals a nivell d'expressió gènica, ni a nivell del metabolisme lipídic.

Impacte de la sobreexpressió de pGKA456V en animals diabètics dejunats durant 5h

- Efectes sobre l'homeòstasi de glucosa:

En primer lloc cal destacar que el tractament dels ratolins amb pGK_{A456V} va provocar una disminució significativa de la glicèmia després de 5 h de dejuni en comparació amb els dos grups control (pControl i pGK) (Figura 77). En canvi, no va ocasionar variacions en els nivells de

lactat sèric respecte el grup pControl (pControl, 7.296 ± 0.772 mM; pGK_{A456V}, 8.778 ± 0.649 mM; pGK, 10.62 ± 0.608 mM – $p < 0.05$ vs pControl i pGK_{A456V}–).

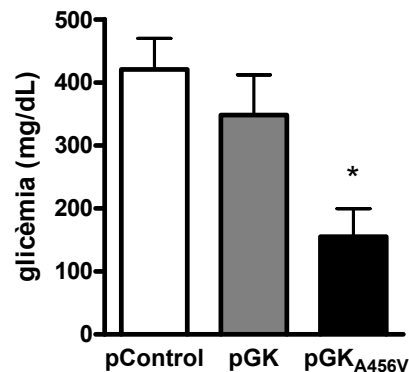


Figura 77. Glicèmia d'animals diabètics 48 h post-injecció i després de 5 h de dejuni. Les barres representen la mitjana \pm l'error estàndard de les dades de glicèmia. N=5. * $p < 0.05$ determinat per one-way ANOVA.

Per entendre com es produïa aquesta disminució de la glicèmia en els animals del grup pGK_{A456V} vam determinar diversos metabòlits hepàtics (Figura 78). En primer lloc, la glucosa entra a l'hepatòcit i és fosforilada per la GK per convertir-se en glucosa-6P. Els animals tractats amb pGK_{A456V} presentaven nivells significativament inferiors de glucosa lliure en el fetge, segurament, perquè també presentaven una glicèmia inferior a la dels altres grups control. Els nivells de glucosa-6P eren similars als del grup control i inferiors als del grup injectat amb pGK. Pel què fa al glicogen, després de 5 h de dejuni, els ratolins amb pGK_{A456V} no tenien una acumulació de glicogen al fetge com s'havia observat en estat d'alimentació. Per tant, hi hauria hagut un increment de la taxa glicogenolítica durant la transició alimentació-dejuni en el grup pGK_{A456V} (Figura 79). En avaluar metabòlits glicolítics com la fructosa-2,6-bisfosfat i el lactat, vam detectar que el grup pGK_{A456V} en tenia un increment no significatiu (Figura 78). Tampoc no s'hi observà un increment significatiu d'ATP. Per tant, els ratolins que sobreexpressaven la GK_{A456V} a la zona perivenosa del fetge no presentaven un increment de la utilització de glucosa, malgrat haver observat un efecte de disminució de la glicèmia.

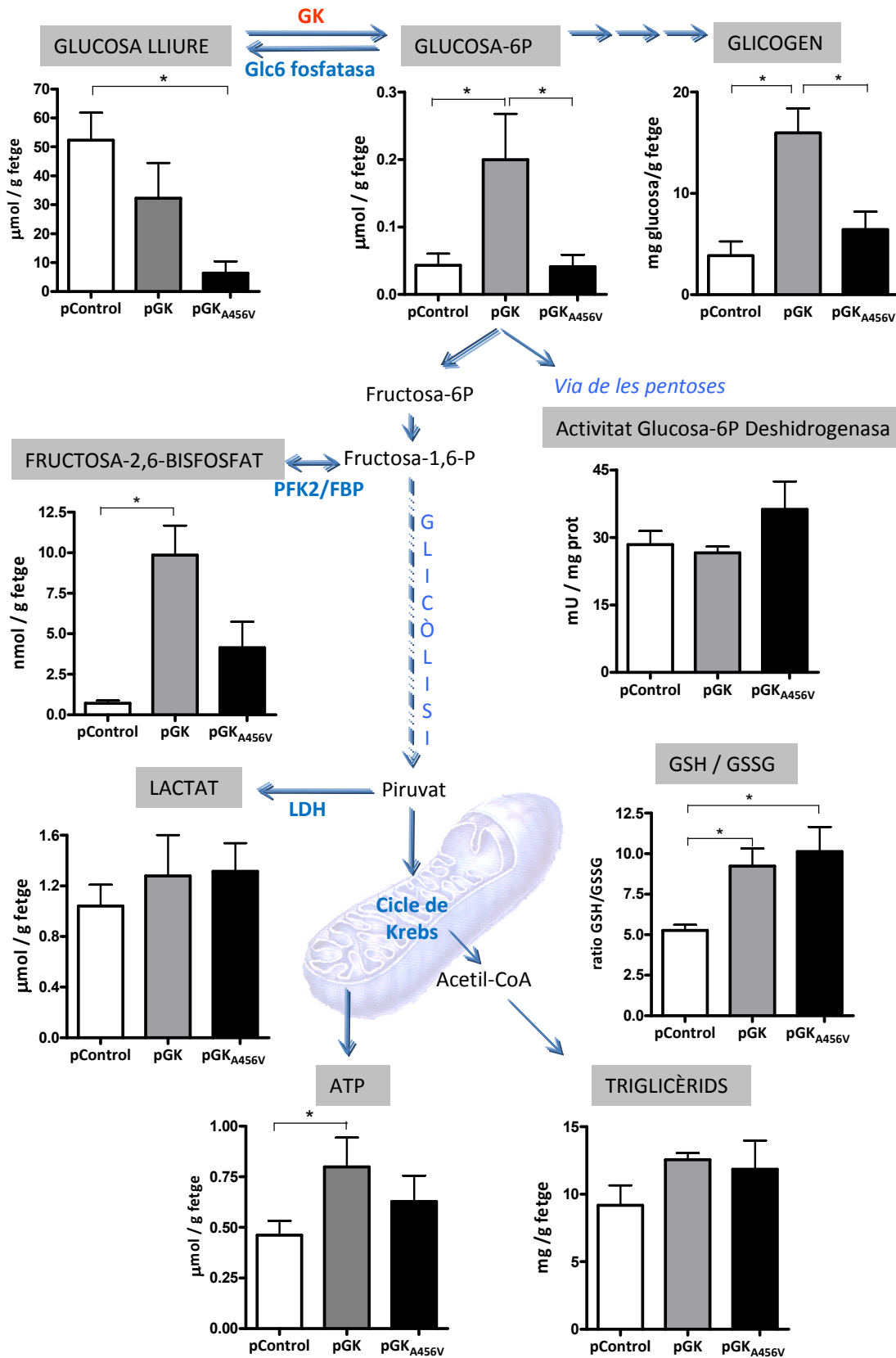


Figura 78. Figura esquemàtica dels metabòlits hepàtics mesurats en els fetges de ratolins diabètics dejunats durant 5 h, 48 h post-injecció de pGK i pGK_{A456V}. Les barres representen la mitjana ± l'error estàndard de les dades. N=5. * p<0.05 determinat per one-way ANOVA.

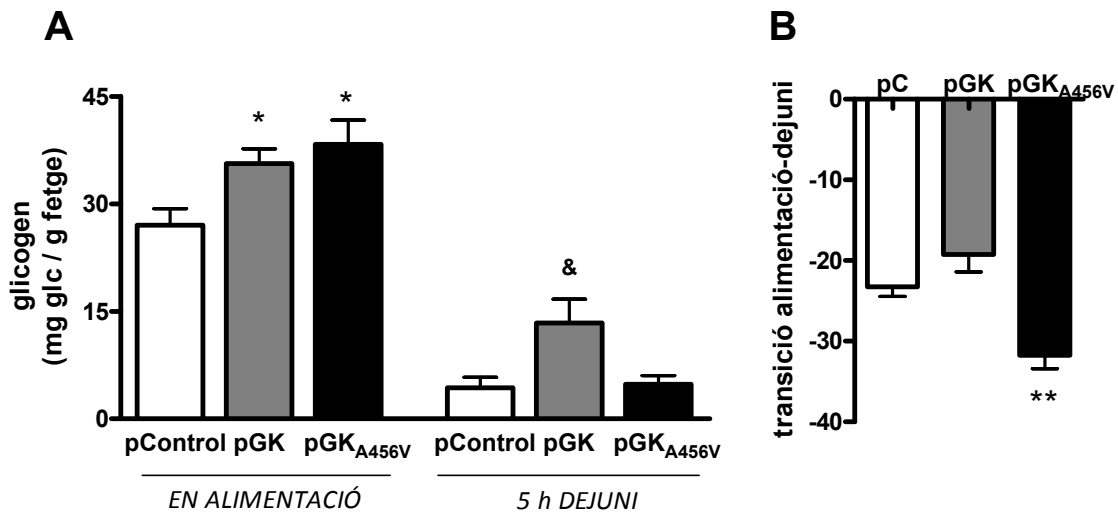


Figura 79. Efectes de la sobreexpressió de pGK i pGK_{A456V} sobre el glicogen en el fetge d'animals amb diabetis tipus 1 induïda amb STZ. (A) Nivells de glicogen en el fetge dels animals en estat d'alimentació i després de 5 h de dejuni. **(B)** Balanç de glicogen entre l'estat d'alimentació i l'estat de dejuni. Les barres representen la mitjana \pm l'error estàndard. N=5-9. * $p < 0.05$ versus pControl; & $p < 0.05$ vs pControl i pGK_{A456V}; ** $p < 0.01$ vs pGK i $p < 0.05$ vs pControl; determinat per one-way ANOVA.

Per clarificar si realment la reducció de la glicèmia observada en el grup pGK_{A456V} era deguda a una major captació i metabolisme de glucosa en el fetge o bé a efectes extrahepàtics, vam decidir realitzar un experiment amb glucosa marcada radioactivament. Per tal d'avaluar l'estat metabòlic que tenia lloc en la transició dejuni-alimentació, vam injectar U-¹⁴C-glucosa en els ratolins diabètics injectats 48 hores abans amb pControl, pGK i pGK_{A456V} i que havien estat dejunats durant 4 hores. Vam escollir la U-¹⁴C-glucosa perquè no té cap limitació a l'hora d'ésser internalitzada i pot seguir qualsevol via metabòlica. Pel què fa a la dosi de U-¹⁴C-glucosa injectada, vam injectar 0.2 mg de glucosa a cada animal, la qual cosa suposava un increment de 1.11 μ mol de glucosa en el torrent sanguini. D'aquesta manera preteníem evitar alteracions de la glicèmia que condicionessin el metabolisme de glucosa. Per altra banda, per evitar pèrdues de radioactivitat en els teixits com a resultat de l'oxidació total de la glucosa a CO₂, vam sacrificar els animals 30 minuts post-administració i vam recollir diversos teixits. En realitzar el comptatge de radioactivitat en els diferents teixits, vam poder constatar que el senyal degut al ¹⁴C incrementava de forma significativa exclusivament al fetge dels ratolins tractats amb pGK i amb pGK_{A456V} (pControl, 100 \pm 7.88%; pGK, 138.73 \pm 14.63%; pGK_{A456V} 144.1 \pm 8.99%; $p = 0.037$ pGK vs pControl i $p = 0.003$ pGK_{A456V} vs pControl).

A continuació vam decidir avaluar la via de les pentoses fosfat en el fetge mitjançant la determinació de l'activitat glucosa-6P-deshidrogenasa en homogenats hepàtics. Malgrat no observar canvis significatius entre els grups experimentals, vam identificar que en la transició alimentació-dejuni hi havia un canvi de tendència entre els grups: mentre que l'activitat

glucosa-6P-deshidrogenasa disminueix en els grups controls pControl i pGK, incrementava en el grup pGK_{A456V} (Figura 80).

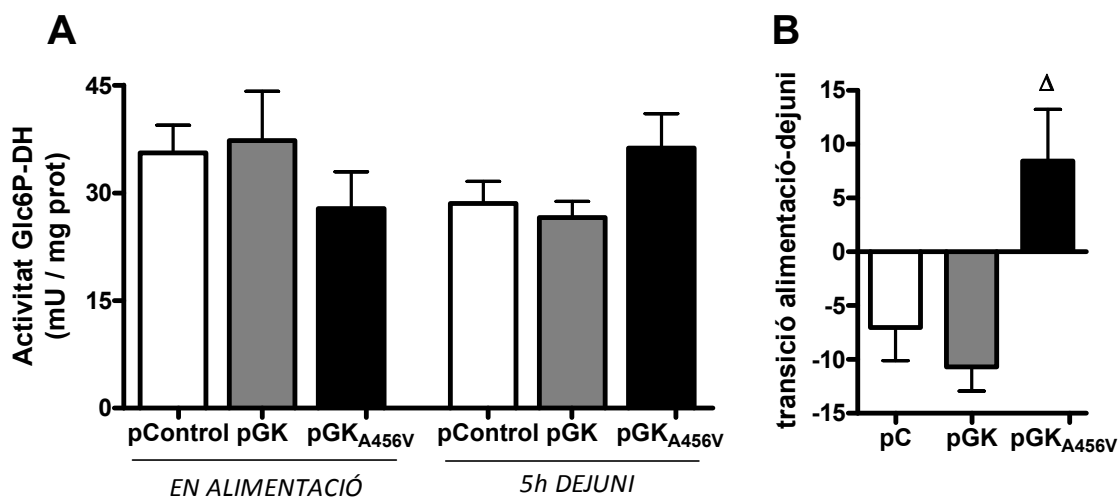


Figura 80. Efectes de la sobreexpressió de pGK i pGK_{A456V} sobre l'activitat glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (Glc6P-DH) en el fetge d'animals amb diabetis tipus 1 induïda amb STZ. (A) Activitat Glc6P-DH mesurada en extractes hepàtics obtinguts en estat d'alimentació i en estat de dejuni. (B) Variació de l'activitat Glc6P-DH entre l'estat d'alimentació i l'estat de dejuni. Les barres representen la mitjana ± l'error estàndard. N=5-9. Δ p<0.05 vs pControl i pGK_{A456V}; determinat per one-way ANOVA.

- Efectes sobre el metabolisme lipídic:

Mentre que la sobreexpressió de pGK al fetge de ratolins diabètics va provocar dislipidèmia, els animals que expressaven la GK_{A456V} en el fetge perivenós no van presentar alteracions en els nivells de TAG i de AGL sèrics (Taula 28). Per altra banda, el contingut de TAG hepàtics no era significativament diferent dels controls (Figura 78). En canvi, el tractament amb pGK_{A456V} va provocar un augment dels nivells de β-hidroxiubutirat en el sèrum (Taula 28).

	pControl	pGK	pGK _{A456V}
AGL (mM)	0.325 ± 0.098	0.663 ± 0.104 *	0.401 ± 0.050
TAG (mg/dL)	35.5 ± 7.719	74.00 ± 14.76 *	38.13 ± 7.66
β-hidroxiubutirat (mM)	0.18 ± 0.032	0.199 ± 0.014	0.27 ± 0.030 #

Taula 28. Determinació dels paràmetres sèrics dels ratolins diabètics injectats amb pGK_{A456V} i pGK, analitzats 48h post-injecció després de 5h de dejuni. Els valors representen la mitjana ± error estàndard de cada grup. n= 5. * p<0.05 vs pControl i pGK_{A456V} determinat per one-way ANOVA; # p<0.05 vs pControl, determinat per one-way ANOVA.

- Anàlisi de la regulació del metabolisme hepàtic:

Per tal d'elucidar el mecanisme responsable del perfil metabòlic observat, vam analitzar l'expressió gènica i el contingut proteic de determinats enzims reguladors i de factors de

transcripció. Pel què fa a la via glicolítica, el tractament amb pGK_{A456V} no va provocar cap alteració en l'expressió del gen *Gck* de ratolí ni del factor de transcripció *c-Myc*, en comparació amb el grup pControl (Figura 81). Per altra banda, a nivell proteic tampoc no vam observar un augment significatiu de la proteïna PFK-2 en comparació amb pControl; només vam detectar un lleuger increment del contingut de L-PK (Figura 83).

A l'hora d'avaluar si la GK_{A456V} podria induir lipogènesi tal i com està descrit per l'increment de GK al fetge [117, 354, 355] i com hem demostrat al capítol 1 d'aquesta tesi, vam detectar que els nivells de mRNA dels factors de transcripció implicats en el control de la via lipogènica SREBP-1c i LXR α no estaven alterats en els fetges dels ratolins injectats amb pGK_{A456V} (Figura 81). En canvi, presentaven un lleuger increment malgrat que no significatiu de ChREBP, tant a nivell de mRNA com de proteïna. Consistentment, l'expressió dels enzims lipogènics com FAS i l'enzim màlic (codificat per *Mod1*) era lleugerament superior en el grup pGK_{A456V} en comparació al grup pControl, però inferior que al grup pGK (Figura 81). El mateix resultat s'observà per ACC a nivell de proteïna (Figura 83).

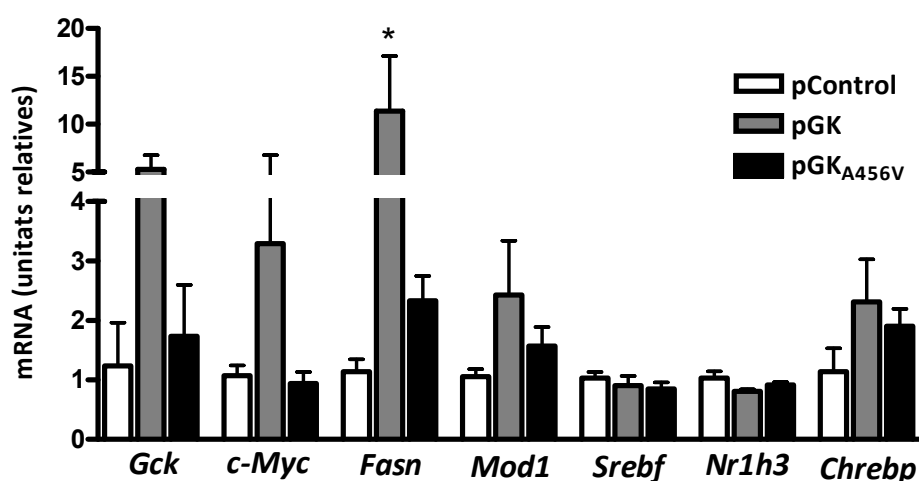


Figura 81. Anàlisi d'enzims i factors de regulació de la via glicolítica i la via lipogènica en el fetge de ratolins diabètics tractats amb pGK_{A456V} i pGK. A les 48 h post-injecció i després de 5 hores de dejuni, es van obtenir els fetges dels ratolins i s'analitzaren els nivells d'expressió de determinats gens per qRT-PCR. Les barres representen la mitjana \pm error estàndard de cada grup. Es van realitzar els càlculs en relació al grup control i seguint els algorismes del $\Delta\Delta Ct$ descrits per Applied Biosystems. $n=5$. * $p<0.05$ respecte pControl, determinat per One-way ANOVA.

Diversos treballs de sobreexpressió de GK en el fetge d'animals amb diabetis tipus 1, inclosos els resultats presentats en el capítol 1 d'aquesta tesi, han demostrat que l'increment d'activitat GK provoca una disminució de la via gluconeogènica [116, 354]. En avaluar els fetges dels ratolins tractats amb pGK_{A456V} no vam detectar variacions respecte els pControl a nivell de l'expressió dels gens que codifiquen per a enzims claus de la gluconeogènesi, com són la PEPCK-C i el

mateix transportador de glucosa GLUT-2 (Figura 82); malgrat que els nivells de proteïna PEPCK-C sí que estaven disminuïts (Figura 83). També vam observar que els factors de transcripció PGC-1 α i HNF4 α , implicats en la regulació de la gluconeogènesi, presentaven uns nivells intermedis entre el grup pGK i el grup pControl (Figura 82). En canvi, s'observà una gran inducció de l'expressió de la subunitat catalítica de la glucosa-6 fosfatasa en el grup pGK_{A456V}, en comparació amb pControl i pGK (Figura 82).

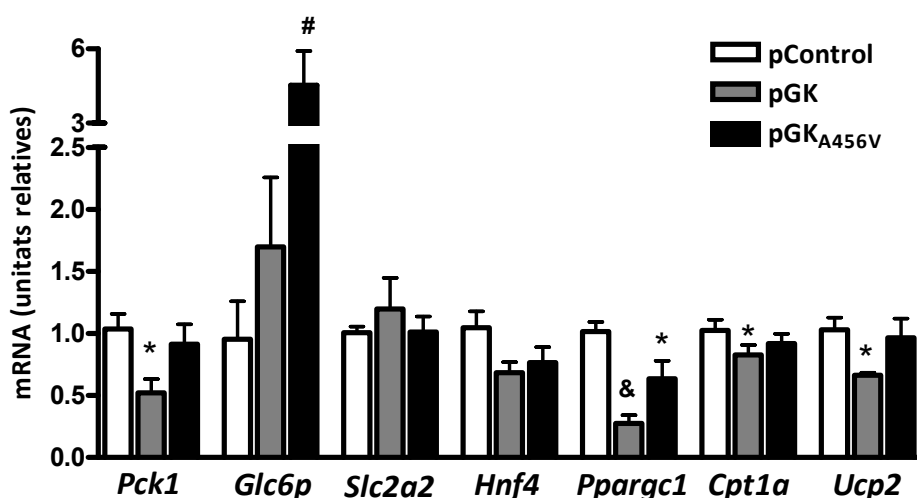


Figura 82. Anàlisi d'enzims i factors de regulació de la via gluconeogènica i del metabolisme energètic en el fetge de ratolins diabètics tractats amb pGK_{A456V} i pGK. A les 48 h post-injecció i després de 5 hores de dejuni, es van obtenir els fetges dels ratolins i s'analitzaren els nivells d'expressió de determinats gens per qRT-PCR. Les barres representen la mitjana \pm error estàndard de cada grup. Es van realitzar els càlculs en relació al grup control i seguint els algorismes del $\Delta\Delta C_t$ descrits per Applied Biosystems. n=5. * p<0.05 respecte pControl, # p<0.05 vs pControl i pGK, & p<0.001 vs pControl i p<0.05 vs pGK_{A456V}, determinat per One-way ANOVA.

En avaluar trànscrips i proteïnes relacionades amb el metabolisme energètic i la funció mitocondrial vam detectar que el tractament amb pGK_{A456V} no afectava els nivells de mRNA de Cpt1a ni de Ucp2 en comparació amb el grup pControl (Figura 82). Per altra banda tampoc no variaren els nivells de proteïna SOD2 (Figura 83).

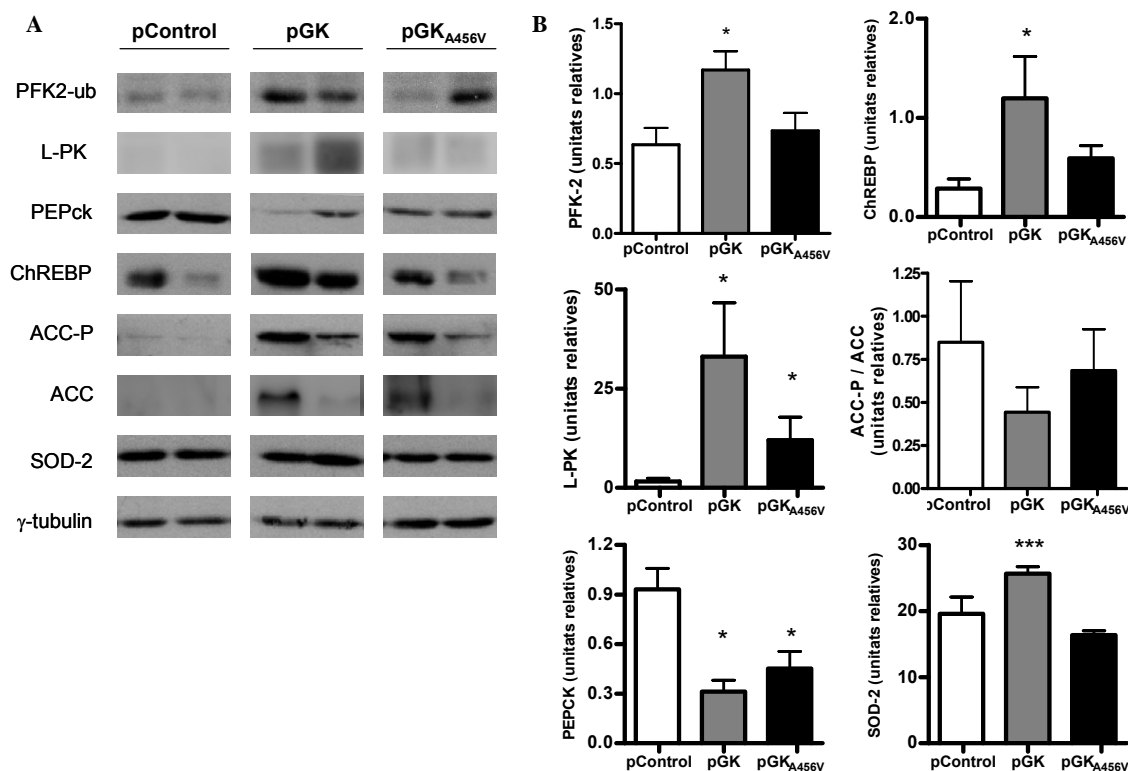


Figura 83. Anàlisi per Western blot dels fetges de ratolins diabètics injectats amb pGK i pGK_{A456V} Els fetges dels ratolins van ésser obtinguts 48 h post-injecció en estat de dejuni (5h), es van homogeneïtzar i resoldre per *Western blot*. (A) Figura representativa del Western blot resolt 3 vegades independents. (B) Anàlisi densitomètrica de les bandes del Western versus la γ -tubulina. N=4, * $p < 0.05$ vs pControl, *** $p > 0.001$ vs pGK_{A456V}.

Compartimentalització de la localització cel·lular de GK i GK_{A456V}

Per intentar entendre les diferències metabòliques observades entre els fetges dels ratolins del grup pGK i del grup pGK_{A456V}, vam plantejar-nos la possibilitat que la GK i la GK_{A456V} presentessin diferent localització cel·lular en el fetge dels ratolins, tal i com apuntaven els nostres estudis en hepatòcits en cultiu (presentats anteriorment). La localització nuclear de la GK és deguda a la interacció amb la proteïna GKR, la qual reté la GK al nucli quan les concentracions de glucosa són baixes i l'allibera al citosol quan hi ha insulina, fructosa-1-fosfat o altes concentracions de glucosa [189, 190]. Per visualitzar la localització cel·lular de la GK_{A456V} vam realitzar un estudi d'immunohistoquímica en seccions de fetge dels ratolins diabètics tractats amb pControl, pGK i pGK_{A456V} i dejunats durant 5h. Tal i com es mostra a la figura 84, així com la proteïna GK del grup pGK presentava immunoreactivitat sobretot al nucli de l'hepatòcit, la proteïna GK_{A456V} estava localitzada predominantment al citosol dels hepatòcits transfectats. Cal tenir en compte que en aquest model animal de diabetis tipus 1 no hi ha senyal de la GK endògena, per tant, en el cas del grup pGK_{A456V}, tot el senyal de fluorescència prové de la GK_{A456V} transfectada.

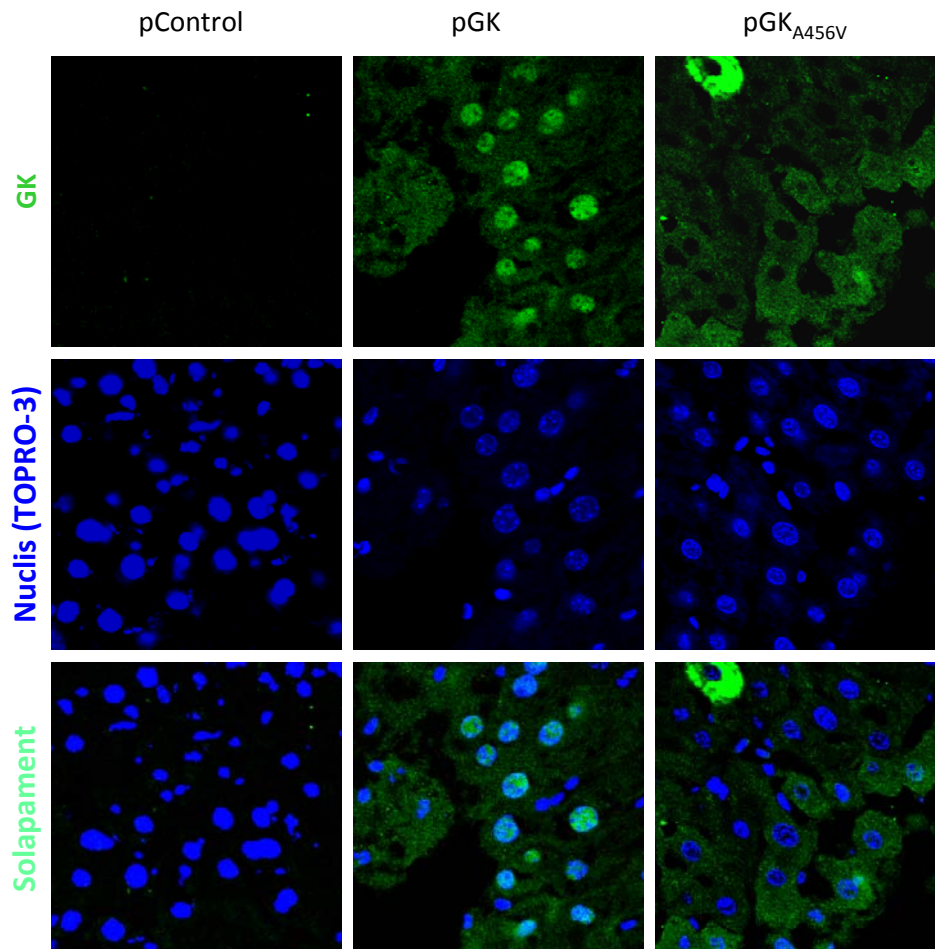


Figura 84. Localització de GK i de GK_{A456V} dins l'hepatòcit. Es va realitzar una tinció immunològica amb l'anticòs per a la GK (en verd) a seccions de 7 µm de fetge dels ratolins injectats amb pControl, pGK o pGK_{A456V} i dejunats durant 5h. Es va utilitzar TO-PRO-3 per a visualitzar els nuclis (en blau). Es mostren les imatges representatives i augmentades 400X.

En el transcurs d'aquesta tesi han aparegut diversos treballs que recolzen els resultats obtinguts, segons els quals la mutació A456V confereix la manca de regulació per GKRP i en conseqüència la proteïna GK_{A456V} tindria alterat el patró de distribució intracel·lular [262, 427].

DISCUSSIÓ

L'expressió de la proteïna GK_{A456V} en el fetge perivenós d'un model animal de diabetis tipus 1 induïda experimentalment amb STZ, el qual presenta nivells indetectables de proteïna GK salvatge, ens ha permès demostrar i/o corroborar dues hipòtesis inicials:

1)- En primer lloc, hem pogut determinar *in vivo* que la mutació A456V confereix uns canvis cinètics d'augment d'afinitat per a la glucosa en la GK de rata (ja que a baixes concentracions de glucosa vam detectar major activitat GK), tal i com s'havia descrit per la GK humana [247], la qual cosa era esperable degut a l'alta homologia de seqüència entre la GK de les dues espècies.

2)- El 2004, quan Kamata *et al* van publicar les bases estructurals de la regulació al·lostèrica de la GK [136], se'ns va plantejar la possibilitat que la GK_{A456V} i la GK salvatge podien ésser regulades de manera diferent a nivell d'interaccions proteiques. Tal i com ja s'ha esmentat en el primer apartat d'aquest capítol, vam demostrar *in vitro* que la GK_{A456V} no es translocava al nucli dels hepatòcits diabètics en presència d'un excés de GKR. Per altra banda, també s'havia descrit la manca d'unió entre GKR i GK_{A456V} mitjançant estudis cinètics *in vitro* [262]. Però, el nostre model de ratolins amb diabetis tipus 1 transfectats amb pGK_{A456V} ha permès demostrar per primera vegada *in vivo* que la mutació A456V altera la distribució de la proteïna GK a l'interior de l'hepatòcit com a conseqüència de la desregulació per GKR, ja que en els estudis d'immunohistoquímica de seccions de fetge s'observà una distribució predominantment citosòlica de la proteïna GK_{A456V}. Aquests resultats d'immunohistoquímica contrasten amb la inestabilitat de la proteïna GK_{A456V} demostrada en el fetge dels ratolins transgènics GK_{A456V} descrits per Pino *et al* [427]. Els ratolins *knock-out* per GKR també presentaven una disminució de la quantitat de proteïna GK al fetge, demostrant que la interacció amb GKR és essencial per a mantenir els nivells de GK [186, 187]. En el nostre model, potser per la manca de control transcripcional endogen del transgen, s'han pogut obtenir nivells similars de proteïna GK_{A456V} i de GK, tal i com es va poder comprovar tant a nivell d'activitat GK com a nivell de *Western blot*.

En conjunt podem afirmar que la mutació activadora A456V en la GK de rata provoca uns canvis conformacionals que confereixen una activació al·lostèrica de l'enzim i una desregulació per GKR *in vivo*. Idènticament, diversos estudis han demostrat que la unió dels activadors sintètics a la GK humana confereix els mateixos canvis conformacionals descrits per la mutació

activadora A456V, que resulten en una activació de l'enzim i en manca d'inhibició per GKR [136, 137, 180, 200, 357, 447]. Amb aquesta premissa vam considerar oportú extrapolar els possibles efectes dels activadors sintètics de GK al fetge a partir dels resultats obtinguts amb la transfecció hepàtica de pGK_{A456V} en ratolins diabètics, amb la finalitat d'avaluar la potencialitat de l'acció dels activadors sintètics exclusivament al fetge com a estratègia terapèutica per a la diabetis.

En estat d'alimentació, els resultats obtinguts amb la sobreexpressió de GK_{A456V} foren molt similars als que presentaven els ratolins injectats amb pGK. Ambdós grups presentaven una disminució lleugera però significativa de la hiperglicèmia diabètica, conjuntament amb un increment significatiu del contingut hepàtic de glicogen així com una inducció del metabolisme glucídic tal i com es pot deduir dels nivells elevats de fructosa-2,6-bisfosfat en el fetge. No observàrem canvis a nivell de metabolisme lipídic ni grans alteracions en l'expressió gènica. D'entrada, en situació d'alimentació les dues formes de GK podrien comportar-se de manera similar ja que ambdues presentarien una localització predominantment citosòlica.

Després de 5 h de dejuni, la sobreexpressió de GK_{A456V} comportà una reducció molt important de la glicèmia, de l'ordre del 60% en comparació amb els dos grups control, pControl i pGK. La reducció de la glicèmia exclusivament durant el dejuni també s'observa en humans portadors de la mutació P446L a la proteïna GKR, els quals tenen afectada la interacció GK-GKR [211, 428]. No obstant, l'expressió de GK_{A456V} no provocà canvis en la concentració de lípids sèrics tal i com havia estat descrit en estudis previs de sobreexpressió de GK [270, 355] i en els humans portadors de la mutació P446L a la proteïna GKR [211, 428]. Tant factors cinètics com de regulació podrien explicar aquestes diferències.

Vam cercar quin podria ésser el mecanisme causant de la disminució de la glicèmia en els ratolins que expressaven GK_{A456V} mitjançant l'anàlisi del contingut de metabòlits hepàtics i del contingut de proteïnes i mRNAs importants en la regulació hepàtica. Els resultats, poc previsibles, es detallen a continuació:

1- Lleu increment del metabolisme i utilització de glucosa al fetge. En comparació amb els animals injectats amb pGK, els ratolins del grup pGK_{A456V} presentaven nivells inferiors d'indicadors de glicòlisi i de metabolisme de glucosa com són la fructosa-2,6-bisfosfat i la proteïna L-PK, però superiors als del grup pControl. Altres indicadors com la glucosa-6-fosfat o la isoforma ubiqua de la PFK-2 estaven a nivell del grup pControl.

2- Molt lleu inhibició de la gluconeogènesi hepàtica. La GK, a través de la producció de xilulosa-5P i la posterior activació de ChREBP, mitjança la inhibició de la gluconeogènesi per

glucosa [34, 35]. La fructosa-2,6-bisfosfat també ha estat associada amb l'efecte inhibitori de la gluconeogènesi degut al metabolisme de glucosa [31]. La sobreexpressió de pGK_{A456V} genera un augment lleu de ChREBP i de fructosa-2,6-bisfosfat els quals no deuen ésser suficients per a produir una inhibició important de l'expressió d'enzims gluconeogènics com la PEPCK-C, malgrat que observàrem una disminució de PEPCK-C a nivell de proteïna. També detectàrem que l'expressió del factor de transcripció PGC-1 α estava disminuïda en el grup pGK_{A456V} en comparació amb el grup pControl, però era significativament superior a la del grup pGK.

Analtzats aquests dos punts, resultava difícil explicar l'efecte hipoglucemiant de la GK_{A456V} ja que no produïa ni una clara activació de la glicòlisi i metabolisme de glucosa, ni una clara inhibició de la gluconeogènesi. Concretament, l'enzim implicat en l'últim pas de la via gluconeogènica, la glucosa-6-fosfatasa, presentava una clara activació de la seva transcripció en el grup pGK_{A456V} en comparació amb els dos grups controls.

3- Inducció de la glucosa-6-fosfatasa i possible activació de la glicogenòlisi i del cicle de glucosa. La glucosa-6-fosfatasa està regulada a nivell transcripcional per la insulina i també per la glucosa, malgrat que ambdues tenen accions contràries: mentre que la insulina n'inhibeix la transcripció, la glucosa l'activa [448]. En diabetis, a causa de la manca d'insulina i de la hiperglicèmia, l'expressió de la glucosa-6-fosfatasa està incrementada i contribueix a la producció hepàtica de glucosa típica de la malaltia. No obstant, l'efecte estimulador de la glucosa sobre l'expressió del gen de la glucosa-6-fosfatasa és dominant sobre l'efecte inhibitori de la insulina, tal i com confirmen diversos estudis *in vitro* [34, 35, 448, 449] i *in vivo* amb animals sans [271] i diabètics tipus 1 [354]. Aquests estudis farien preveure que la sobreexpressió de GK induiria la transcripció de la glucosa-6-fosfatasa independentment de l'estat hormonal de l'animal. Per tant, el senyal de glucosa al fetge induiria una inhibició de la PEPCK-C i una activació de la glucosa-6-fosfatasa, tal i com també provoca el tractament amb AICAR (activador inespecífic de l'AMPK), mentre que les activadors específics de l'AMPK ocasionen una disminució de la transcripció de la PEPCK-C i de la glucosa-6-fosfatasa [450].

En el nostre model, la sobreexpressió de GK no induïa un augment significatiu de l'expressió de glucosa-6-fosfatasa però sí que hi havia una disminució clara dels nivells de PEPCK-c, ja sigui per raons de zonació o bé per la necessitat de lliar diferents de metabolisme de glucosa per regular els gens que responen a glucosa. A part d'aquests motius esmentats, les vies de senyalització que dirigeixen la transcripció de la glucosa-6-fosfatasa en resposta a glucosa poden ésser diferents i independents a ChREBP [271, 448], malgrat que encara no es coneixen, i potser no estan alterades en el nostre model. En el cas del grup pGK_{A456V}, l'augment d'activitat glucosa-6P deshidrogenasa que s'observa en la transició d'alimentació a dejuni podria explicar l'activació de la transcripció de la glucosa-6-fosfatasa. En aquesta línia Massillon *et al* van

demostrar que l'activació de la branca no oxidativa de les pentoses fosfat modulava els nivells i l'estabilitat del mRNA de la glucosa-6-fosfatasa d'una manera independent a la insulina [34, 35].

L'increment de glucosa-6-fosfatasa podria estar relacionat amb la disminució dels nivells de glicogen que s'observa en el grup pGK_{A456V} durant la transició alimentació-dejuni, perquè diversos estudis demostren que la sobreexpressió dels components P36 o P46 de la glucosa-6-fosfatasa resulten en una disminució dels nivells de glicogen a l'hepatòcit [449, 451-453]. Per altra banda, existeixen treballs en què una manca d'activitat del sistema glucosa-6-fosfatasa resulta en la malaltia "*glycogen storage disease type 1a*" i també s'ha demostrat que un animal "*knock-out*" per a la glucosa-6-fosfatasa presenta acumulació de glicogen al fetge [454].

En el grup pGK_{A456V}, el fet de tenir una elevada activitat GK al citosol conjuntament amb una elevada activitat glucosa-6-fosfatasa podria servir, a part de controlar els nivells de glicogen per evitar un emmagatzematge excessiu [448], per induir un cicle fútil entre la glucosa i la glucosa-6P conegut amb el nom de cicle de glucosa [148]. La raó fisiològica d'aquest cicle fútil no és coneguda, però és àmpliament demostrat que en els moments després de la ingesta en què augmenta l'activitat GK també s'indueix, pel propi metabolisme de la glucosa, la glucosa-6-fosfatasa. En aquest punt, és interessant recordar els estudis de Nordlie [436, 455], els quals proposaven que la glucosa-6-fosfatasa en presència d'alts nivells de glucosa podia actuar de fosfotransferasa que usava el carbamoil-fosfat com a donador de fosfats. Si la glucosa-6-fosfatasa té un paper en la fosforilació de glucosa és qüestionable. No obstant, la inducció paradoxal del gen de la glucosa-6-fosfatasa per glucosa podria indicar un possible paper d'aquest enzim en l'extracció de glucosa del torrent sanguini en els estats post-absortius.

4 - Lleu inducció de la lipogènesi hepàtica. Després d'haver comprovat que la sobreexpressió de GK era qüestionada com a teràpia per a la diabetis pels seus efectes lipogènics, cal destacar que la sobreexpressió de la GK_{A456V} ocasionà una inducció molt inferior que la GK de les vies lipogèniques (avaluades a través de la determinació de Srebp-1c, ChREBP, FAS i l'enzim màlic) i, a més a més, no generà dislipidèmia. De fet, els humans que presenten la mutació A456V no pateixen alteracions dels perfils lipídics, malgrat que existeix una gran variabilitat de fenotip, inclòs en una mateixa família. Només en alguns casos s'ha descrit un lleuger augment dels TAG sanguinis [248].

Finalment cal remarcar que la mutació A456V pot afectar altres reguladors de la biologia de la GK, com són PFK-2 o BAD, i explicar part dels resultats obtinguts.

En conjunt, hem demostrat que l'expressió de GK_{A456V} en el fetge de ratolins amb diabetis tipus 1 genera una reducció de la glicèmia diabètica probablement per la seva capacitat d'induir la

glucosa-6 fosfatasa i el cicle de glucosa. En aquestes condicions, la glicèmia és reduïda mentre que també es redueix l'impacte lipogènic de l'excés de metabolisme de glucosa. Per tant, podem concloure que tant la manca de regulació per GGRP com les característiques cinètiques particulars que confereix la mutació A456V poden influir diferencialment sobre el metabolisme hepàtic en comparació amb la GK salvatge. A més a més, els nostres resultats recolzen la possibilitat que es puguin emprar els activadors sintètics de GK exclusivament al fetge com a estratègia antidiabètica. En aquest sentit seria interessant poder realitzar estudis de sobreexpressió hepàtica de GK_{A456V} en models animals de diabetis de tipus 2, per avaluar-ne l'impacte metabòlic en el context de resistència a insulina i d'obesitat.

Durant l'escriptura d'aquesta tesi ha aparegut el primer treball que presenta un activador sintètic de GK selectiu pel fetge com a possible agent terapèutic per a la diabetis de tipus 2 [456]. Aquest compost activa l'enzim GK *in vitro* a concentracions de l'ordre de nanomolar i s'ha demostrat que millora el perfil glicèmic en un test de tolerància a glucosa realitzat en animals sans. El mateix grup està pendent de publicació a la revista Diabetes d'un estudi que porta per títol "*The novel glucokinase activator LBX192 stably reverses diabetes and obesity, prevents liver steatosis and increases energy expenditure in diet-induced obese mice*", tal com esmenten en la seva última publicació accessible [456].

DISCUSSIÓ GENERAL

*Miri un arbre per la finestra. Torni'l a mirar de nit.
Intenti-ho en un dia de pluja. Després, miri'l amb un aparell d'infrarojos.
Imagini's com el pot veure un ratpenat, un elefant o algú que no pot distingir els colors.
Quin és l'aspecte veritable de l'arbre? Algun dels que hem esmentat? Cap?*

Immanuel Kant

*No veiem les coses tal com són,
les veiem tal com som.*

Anaïs Nin

La GK hepàtica desenvolupa un paper central en el control del metabolisme glucídic de l'organisme, com posa de manifest el fet que canvis en l'activitat GK desemboquen en malaltia (diabetis o PHHI). Concretament en el cas de la diabetis, hi ha una disminució de la GK hepàtica ja sigui per la manca d'insulina o de resposta a aquesta hormona (diabetis de tipus 1 i de tipus 2, respectivament). Per tant, una estratègia lògica per a tractar la diabetis és incrementar el metabolisme hepàtic de la glucosa mitjançant un augment de l'activitat GK al fetge. Les característiques bioquímiques i estructurals de la GK permeten que actualment l'augment de l'activitat GK al fetge pugui assolir-se de dues maneres diferents: sobreexpressant la GK per augmentar-ne el nombre de molècules o bé activant les molècules de GK existents (amb GKAs).

En el cas de la sobreexpressió de GK al fetge, s'ha avaluat o bé amb animals transgènics o bé amb transferència gènica adenovírica [36, 116-118, 134, 269-272, 349, 354-356]. Els diferents estudis es poden agrupar de la següent manera:

- En animals sans, en la majoria dels casos la sobreexpressió de GK condueix a una disminució de la glicèmia que va acompanyada d'una disminució de la insulinèmia. Ara bé, en alguns estudis a llarg termini els animals que sobreexpressen la GK esdevenen resistents a insulina [117] (expressen la GK sota el control del promotor de la PEPCK-C, amb expressió majoritària a la zona periportal), mentre que en altres no [118, 269] (expressen la GK sota el control de promotor de l'apopteïna A1 –sense localització zonal clara-, o del control endogen de la GK –perivenós-).

Amb aquests antecedents vam plantejar-nos avaluar si les diferències entre aquests models podien ésser explicades amb el concepte de la zonació hepàtica, és a dir, considerant que la GK s'expressa majoritàriament de manera fisiològica a la zona perivenosa de l'acinus hepàtic. Per assolir-ho vam emprar la transferència gènica hidrodinàmica que permet l'entrada de DNA nuu (plasmidi pCpG/GK) majoritàriament als hepatòcits que envolten a la vena central, en un model de ratolins sans de la soca Balb/c. 53 dies després de la injecció, els ratolins presentaven una alteració del metabolisme glucídic i lipídic que es corresponia amb el fenotip de resistència hepàtica a la insulina estudiat en ratolins LIRKO [296]. La causa d'aquesta resistència exclusivament hepàtica a la insulina seria un augment de l'estrès oxidatiu degut a un increment de l'activitat de la cadena respiratòria mitocondrial.

- En el context de la diabetis, la sobreexpressió de la GK està associada a una millora del fenotip diabètic (augment de la captació i del metabolisme de glucosa al fetge que condueix a la disminució de la hiperglicèmia diabètica). Ara bé, en alguns estudis

aquesta millora va acompanyada d'un increment de la lipidèmia i/o d'esteatosi hepàtica [270, 271, 354, 355]. En avaluar la sobreexpressió de GK a la zona perivenosa en un model de ratolins amb diabetis de tipus 1 induïda amb STZ, vam poder concloure que hi havia una inducció de les vies lipogèniques al fetge i un augment de la lipidèmia. Aquest fet podia ésser previsible si tenim en compte que a la zona perivenosa hi ha un major potencial lipogènic. Però no desembocà en un augment de l'esteatosi hepàtica, potser perquè estaria activada la secreció de VLDL la qual no està confinada a cap zona del parènquima hepàtic.

En el cas de l'activació de la GK, ens vam plantejar avaluar els efectes de l'activació selectiva de la GK hepàtica. Fins el moment només s'han descrit models d'activació de GK inespecífica, amb GKAs administrats sistèmicament [137, 180, 200, 357, 358, 360-363]. Vam simular l'activació de la GK per GKAs mitjançant l'ús d'una mutació activadora de la GK, la GK_{A456V}, que li confereix propietats cinètiques i reguladores idèntiques a l'activació amb GKAs [247, 262]. Vam introduir la GK_{A456V} al fetge perivenós de ratolins via injecció hidrodinàmica.

- En un model de ratolins Balb/c sans a llarg termini (53 dies d'expressió), no es detectaren episodis d'hipoglicèmia, però sí una millor tolerància a la glucosa. En cap cas s'observà resistència a insulina com succeeix amb la sobreexpressió de la GK ni cap alteració del metabolisme lipídic.
- En un model de diabetis de tipus 1 induïda amb STZ, l'activació hepàtica de la GK resulta en una millora de la hiperglicèmia diabètica sense produir dislipidèmia.

En conjunt es pot concloure que l'activació de la GK té un major potencial terapèutic que la sobreexpressió d'aquest enzim. La GK activada difereix de la GK silvestre perquè roman en una conformació tancada la major, mentre que la GK silvestre canvia de conformació. La conformació tancada li confereix unes propietats cinètiques especials, amb una major afinitat per a la glucosa. Per altra banda, també evita la regulació per GKRP i, per tant, l'entrada de la GK al nucli. Per tant, en el cas de l'activació de la GK, l'enzim es troba constantment al citosol i té una major capacitat fosforiladora de la glucosa.

Es fa difícil destriar si el potencial terapèutic de la GK_{A456V} és degut a les seves propietats cinètiques, a la seva localització cel·lular, o a la suma dels dos factors. Si ens fixem en el cas dels ratolins amb diabetis de tipus 1 induïda amb STZ, en situació d'alimentació s'obtingué un fenotip semblant tant amb la sobreexpressió com amb l'activació de la GK (disminució de la glicèmia, així com un increment del metabolisme de glucosa al fetge). En canvi després de 5 h de dejuni, la GK sobreexpressada entra al nucli mentre que la GK_{A456V} roman al citosol on pot

continuar exercint la seva activitat fosforiladora de glucosa. És en aquest moment en què les dues formes de GK tenen una localització diferent quan es detecten majors diferències fenotípiques entre els dos grups experimentals (pGK i pGK_{A456V}).

Ara bé, com aconseguix la GK_{A456V} tenir uns efectes beneficiosos pel tractament de la diabetis i per què no produeix resistència a insulina a llarg termini en animals sans? És difícil de precisar ja que en els dos models analitzats no produeix activació de la via glicolítica, ni inhibeix fortament la via gluconeogènica... Considerant que vam fer les anàlisis en estat estacionari, posar s'haurien pogut avaluar millor els mecanismes causants dels fenotips observats en estudis de clampatge, etc.

La diferència més important observada entre els fetges dels animals que expressaven la GK_{A456V} i els dels altres grups fou la inducció de la transcripció del gen que codifica per a la **subunitat catalítica de la glucosa-6-fosfatasa**, tant en animals sans (Balb/c) com en diabètics de tipus 1 (ICR amb diabetis induïda per STZ). L'activitat enzimàtica de la glucosa-6-fosfatasa clàssicament ha estat considerada com la responsable de l'últim pas de la via gluconeogènica i de la via glicogenolítica. No obstant, en el nostre model experimental la inducció de la glucosa-6-fosfatasa no es correspon amb una inducció de la via gluconeogènica. Per aquest motiu, es podria pensar que la glucosa-6-fosfatasa podria tenir *in vivo* alguna altra funció a part de la gluconeogènica. Aquesta hipòtesi podria guanyar força si es tenen en compte diverses dades descrites en la bibliografia:

1. L'activitat glucosa-6-fosfatasa és el resultat de l'acció d'un complex multi-enzimàtic situat al reticle endoplasmàtic. Està format per una subunitat catalítica, coneguda com a G6PC o P36, que està ubicada a la membrana del reticle endoplasmàtic de manera que el seu centre catalític està disposat al lúmen. Per altra banda també s'ha caracteritzat la subunitat transportadora (G6PT o P46) de la glucosa-6P des del citosol fins al lumen. Finalment es postula l'existència d'alguns transportadors de fosfat inorgànic i de glucosa que retornin els productes de l'activitat fosfatasa al citosol, però encara no han estat identificats (Figura 85). En contrast, la subunitat catalítica de la glucosa-6-fosfatasa i el transportador de glucosa-6P han estat ben caracteritzats, tot i que no es coneix la seva estequiometria i les relacions topològiques que puguin tenir.

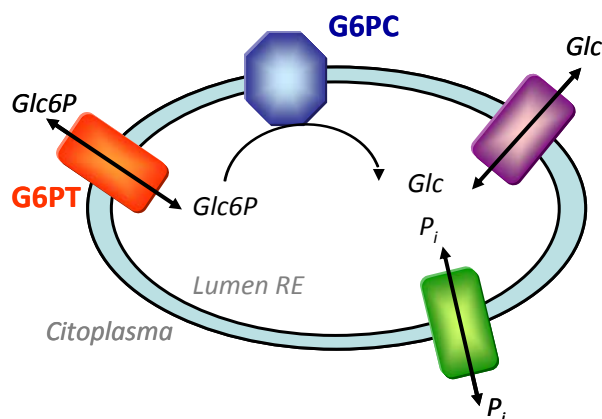


Figura 85. Model del sistema enzimàtic multicomponent de la glucosa-6-fosfatasa. La glucosa-6P (Glc6P) entra al lumen del reticle endoplasmàtic (RE) a través d'un transportador (G6PT). Aleshores és hidrolitzada a glucosa (Glc) i fosfat inorgànic (Pi) per la glucosa-6-fosfatasa catalítica (G6PC). Els productes de la reacció retornarien al citosol a través de transportadors específics. Dades recents suggerixen que la mateixa proteïna podria transportar la glucosa-6P i el Pi. *Adaptat de Hutton et al. JBC 2009.*

Concretament, la subunitat catalítica G6PC està codificada per tres gens diferents:

- *G6pc*: s'expressa predominantment en teixits gluconeogènics com són el fetge i el ronyó, i també s'ha detectat en nivells baixos a l'intestí. La seva expressió està regulada a nivell nutricional i hormonal; per una banda, el glucagó (i l'AMPc), els glucocorticoides, la glucosa i els àcids grassos n'activen la transcripció; mentre que la insulina, TNF- α i la IL-6, la inhibeixen [457]. Mutacions en aquest gen que generen una disminució o manca d'activitat glucosa-6-fosfatasa són responsables de la patologia "*Glycogen storage disease type Ia*". Els individus que la presenten manifesten un increment del glicogen hepàtic i nèfric, que condueix a hepatomegàlia i nefromegàlia; hipercolesterolèmia, hipertriacilgliceridèmia, hiperuricèmia, acidosi làctica i acumulació de greixos al fetge que contribueixen a la hepatomegàlia [458]. Per altra banda, l'expressió d'aquest gen està incrementada en casos de diabetis a causa de la seva regulació per insulina i glucosa.

El més paradoxal pel què fa a la regulació d'aquest gen al fetge és que la glucosa n'indueixi la transcripció, mentre que inhibeix la transcripció d'altres gens implicats en la via gluconeogènica [34, 35, 448, 449]. Rossetti *et al* van suggerir que aquesta acció de la glucosa podria prevenir un emmagatzemament excessiu de glucosa al fetge a més de preparar la transició cap al període post-absorptiu en què caldrà incrementar l'alliberament de glucosa [35].

- *G6pc2*: s'expressa exclusivament a la cèl·lula β pancreàtica. Codifica per una proteïna coneguda també amb el nom de IGRP (*islet-specific glucose-6-*

phosphatase catalytic subunit related protein). En defosforilar la glucosa-6P de la cèl·lula β , la G6PC2 s'oposa a l'acció de la GK i en conseqüència es modera la via glicolítica i la secreció d'insulina estimulada per glucosa [459]. El fet que ratolins G6PC2^{-/-} presentin un fenotip d'hipoglicèmia en un dejuni de 6 h, mentre que les concentracions de glucagó i d'insulina romanen inalterades, indica que la deleció del gen *G6pc2* potencia el flux glicolític i per tant incrementa la sensibilitat a la glucosa a la cèl·lula β [460]. Amb aquests fonaments, s'hipotetitza sobre si la G6PC2 seria un component del sistema sensor de glucosa de la cèl·lula β formant un cicle de glucosa amb la GK pancreàtica.

- *G6pc3*: s'expressa en tots els teixits analitzats fins el moment, per la qual cosa la proteïna codificada per aquest gen es coneix també amb el nom de UGRP (*ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit related protein*) [457].

En conjunt, l'existència d'aquests 3 gens comporta que existeixi activitat glucosa-6-fosfatasa lligada al reticle endoplasmàtic a tots els teixits analitzats fins el moment, dels quals el fetge i el ronyó són els òrgans que presenten una activitat més alta segurament per ésser importants en la gluconeogènesi. Manca saber quina és la funció fisiològica d'aquesta subunitat catalítica als teixits no gluconeogènics.

2. La glucosa-6-fosfatasa (*G6pc*) també pot tenir una funció no gluconeogènica al fetge, com apunta algun treball de sobreexpressió amb adenovirus [451]. Els ratolins sans que sobreexpressaven la glucosa-6-fosfatasa catalítica al fetge tenien un augment de la glicèmia en alimentació i també en un test de tolerància oral a la glucosa, ja que l'augment de l'activitat fosfatasa no permetia augmentar la concentració hepàtica de glucosa-6P fruit de l'activitat GK i, en conseqüència, no es produïa ni síntesi de glicogen ni un augment de la via glicolítica. En canvi en un dejuni, aquests ratolins no tenien efectes en la glicèmia perquè el flux gluconeogènic està regulat principalment per la PEPCCK-C. De nou es reforça el concepte que la glucosa-6-fosfatasa no és un enzim purament gluconeogènic. Segons Aiston *et al* la glucosa-6-fosfatasa tindria la funció reguladora de tamponar la concentració de glucosa-6P a l'hepatòcit, ja que aquest metabòlit és el principal regulador de la síntesi de glicogen i de la glicòlisi. Si això fos cert, la inducció de la glucosa-6-fosfatasa en casos d'hiperglicèmia no seria una conseqüència patològica de la diabetis, sinó un mecanisme compensatori.

3. Si tenim en compte la zonació hepàtica, l'activitat glucosa-6-fosfatasa és superior a la zona periportal que a la zona perivenosa dels fetges de ratolins dejunats. Aquesta dada està en concordança amb diversos estudis histoquímics i pot ésser explicat típicament pel fet que la gluconeogènesi té lloc predominantment a la zona periportal [461]. Ara bé, Jonges *et al* van

determinar que la glucosa-6-fosfatasa perivenosa té el doble d'afinitat per a la glucosa-6P que a la zona periportal [462]. Aquestes diferències cinètiques entre la zona periportal i la zona perivenosa que presenta la glucosa-6-fosfatasa podrien ésser causants d'una diferent funcionalitat de l'enzim en les dues àrees.

4. Aproximadament el 15-20% de l'activitat glucosa-6-fosfatasa hepàtica és present a la membrana nuclear, la qual cosa resulta interessant si tenim en compte la localització nuclear que pot presentar la GK [463]. La major part de l'activitat glucosa-6-fosfatasa és present al reticle endoplasmàtic. S'ha descrit que els mitocondris tenen associacions amb algun fragment de membrana del reticle endoplasmàtic. Aquest fet té una doble importància, per una banda la GK també pot localitzar-se associada al mitocondri. Per l'altra dóna suport a la possible activitat fosfotransferasa que descrivia Nordlie [455] per a la qual caldria un grup carbamoil-fosfat com a donador de fosfats per obtenir glucosa-6P a partir de glucosa. La carbamil-fosfat sintasa I és present al mitocondri i podria proporcionar el substrat carbamoil-fosfat a la glucosa-6-fosfatasa present al reticle endoplasmàtic que està associat a la superfície mitocondrial [464]. Malgrat que l'activitat fosfotransferasa estigui descrita i sigui possible *in vivo* no es coneix encara si hi té lloc i quina seria la seva funció. Per altra banda, aquests estudis també posen de manifest que la glucosa-6-fosfatasa presenta localitzacions cel·lulars properes a la GK, la qual cosa podria indicar que afecten els mateixos *pools* de glucosa-6P que hi pugui haver a l'hepatòcit. En general, la concentració de glucosa està mantinguda pel balanç correcte entre la fosforilació de glucosa i la hidròlisi de glucosa-6P al fetge. La glucosa-6-fosfatasa pot sintetitzar glucosa-6P així com degradar-la, i la seva activitat sintètica seria complementària a l'activitat GK. La relació entre l'activitat fosfotransferasa de la glucosa-6-fosfatasa i l'activitat GK podrien mantenir la glicèmia segons les demandes fisiològiques [436]. En els recents anys diversos estudis de lligament genètic han associat polimorfismes dels gens *G6pc*, *G6pc2*, *Gck* i *Gckr* amb els nivells de glicèmia en dejuni en humans [459, 465]. Sigui com sigui, aquests estudis posen de manifest la importància de la GK, la GKRP i la glucosa-6-fosfatasa en l'homeostasi de glucosa en la població general.

A part dels efectes hepàtics, els ratolins sans que expressaven tant la GK silvestre com la GK_{A456V} a llarg termini mostraren alteracions del teixit adipós en comparació al grup control. Mentre la GK silvestre al fetge conferia un major contingut de TAG als adipòcits epididimals, la GK_{A456V} propiciava una major capacitat catabòlica al teixit adipós. Seria interessant poder establir per quin mecanisme es produeix la comunicació fetge-teixit adipós. Els efectes diferencials del teixit adipós afectaven també el patró de secreció d'adipocines (com la leptina o l'IGFBP-2).

En resum, els estudis d'activació de la GK en animals sans i amb diabetis de tipus 1 posen de manifest que, sigui pels efectes hepàtics (inducció de la glucosa-6-fosfatasa) o pels seus efectes extrahepàtics (hiperplàsia del teixit adipós), l'expressió de GK_{A456V} al fetge confereix un perfil hormonal i metabòlic anti-diabetogènic. Per tant, s'obre la porta a l'estudi d'aquesta estratègia per a la teràpia de la diabetis, sobretot per a la diabetis de tipus 2, a més de l'interès de desxifrar els mecanismes que la possibiliten.

CONCLUSIONS

*Success is going from failure to failure
without a loss of enthusiasm.*

Winston Churchill

1. La tècnica de transferència hidrodinàmica és una bona estratègia per a sobreexpressar una proteïna específicament a la zona perivenosa del fetge..
2. En animals sans, la sobreexpressió de GK al fetge perivenós a curt termini comporta una disminució de la glicèmia i de la insulinèmia en alimentació tal i com també s'esdevé en altres models de sobreexpressió en què no es té en compte el concepte de zonació hepàtica.
3. En animals sans, la sobreexpressió de GK al fetge perivenós a llarg termini comportà una resistència exclusivament hepàtica a la insulina; si bé es mantenia la glicèmia en un rang normal. Probablement fou ocasionada per l'estrès oxidatiu (deduït dels nivells elevats de glutatió i de la disminució de SOD-2) fruit de l'augment de la respiració mitocondrial observada a través del complex I de la cadena respiratòria. Aquesta resistència a insulina es manifestava amb un fenotip molt similar al dels ratolins LIRKO (*liver insulin receptor knock-out*):
 - a. Augment de la insulinèmia.
 - b. Davallada dels nivells sèrics de TAG i AGL, fruit del manteniment de la sensibilitat a la insulina al teixit adipós, on tenia lloc una disminució de la lipòlisi i un augment del contingut de TAG. Al fetge, la sobreexpressió de GK no comportava un increment del contingut lipídic.
 - c. Disminució dels nivells de glicogen hepàtic sense alteració dels nivells de la glucosa-6-fosfatasa.
 - d. Manca d'inhibició de la gluconeogènesi hepàtica en situació d'alimentació (major expressió de GLUT-2, de PGC-1 α i de proteïna PEPCK-C).
 - e. Manca d'activació dels gens glicolítics. No obstant, s'observava un increment del lactat sèric (producte de la glicòlisi) probablement degut a fenòmens extrahepàtics com un increment de la taxa glicolítica i síntesi de glicogen (els ratolins pCpG/GK presentaven un major contingut de glicogen) al múscul esquelètic.
4. En un model de diabetis de tipus 1 induïda amb STZ, la sobreexpressió perivenosa de GK a curt termini, tot i que comportà un increment del metabolisme de glucosa al fetge (increment del glicogen hepàtic, de ub-PFK-2, de L-PK, c-myc) i una disminució de la gluconeogènesi (reducció dels nivells de PEPCK), va provocar dislipidèmia com a resultat de la disminució de la β -oxidació d'àcids grassos (reducció dels nivells de Cpt-1) i una inducció de la lipogènesi hepàtica (augment de FAS, ACC, ChREBP). Altres models de sobreexpressió de GK, descrits a la

literatura, que no tenien en compte el concepte de zonació hepàtica, també presentaven alteracions en el metabolisme lipídic. Per aquest motiu es pot descartar la sobreexpressió hepàtica de GK com a possible teràpia per a la diabetis.

5. La GK_{A456V} de rata té una major afinitat per a la glucosa que la GK silvestre, tal i com succeeix amb la forma humana. A nivell de regulació, la GK_{A456V} de rata no s'uneix a la GKRP de manera que s'impossibilita la localització nuclear de l'enzim. Per tant, la GK_{A456V} de rata té unes característiques pràcticament idèntiques a la GK activada per GKAs.

6. En ratolins sans, la sobreexpressió al fetge perivenós de la GK_{A456V} a curt termini va comportar una disminució de la glicèmia i la insulièmia, sense generar episodis d'hipoglicèmia.

7. La sobreexpressió de GK_{A456V} durant 53 dies al fetge perivenós de ratolins sans genera un fenotip amb un perfil metabòlic similar als animals controls, sense alteracions dels nivells de glúcids i lípids (sèrics i hepàtics). Al fetge, malgrat que no provoca canvis en el metabolisme glucídic (no canvien enzims glicolítics) ni lipídic (no canvien els enzims lipogènics), l'activació de la GK promou la inducció de la glucosa-6-fosfatasa i una disminució de la respiració a través del complex II. Per altra banda, la presència de la GK activada al fetge resulta en una activació del catabolisme al teixit adipós que comportà un canvi en l'expressió d'adipocines (augment de IGFBP-2 i disminució de RBP-4).

8. En el fetge perivenós d'un model de diabetis de tipus 1 induïda per STZ, la GK_{A456V} comportà una rellevant disminució de la hiperglicèmia diabètica tot i tenir un lleu efecte sobre l'activació del metabolisme de glucosa i una lleu inhibició de la gluconeogènesi hepàtica. Destaca la inducció de l'expressió de la glucosa-6-fosfatasa la qual cosa suggereix que aquest enzim té un paper no gluconeogènic. Sobretot és interessant que la millora de la hiperglicèmia diabètica no va acompanyada d'alteracions del metabolisme lipídic.

9. En conjunt, els nostres resultats suggereixen que l'activació de la GK exclusivament al fetge és una estratègia terapèutica millor per a la diabetis que la sobreexpressió de la GK.

MATERIAL I MÈTODES

*Si té remei, per què et queixes?
Si no té remei, per què et queixes?*

Proverbi oriental

*El geni es compon d'un 2% de talent
I del 98% de perseverant aplicació*

Ludwig Van Beethoven

TÈCNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR

1. VECTORS PLASMÍDICS

Els vectors plasmídics emprats en aquest treball han estat els següents:

	Proveïdor	Promotor	Antibiòtic selecció
PEPCK/GK	Dra. Fàtima Bosch	PEPCK	Ampicil·lina
pBluescript [®] II SK (+/-)	Fermentas		Ampicil·lina
pCAGGs		β -Actin	Ampicil·lina
pCAGGs/GK		β -Actin	Ampicil·lina
pCAGGs/GK _{A456V}		β -Actin	Ampicil·lina
pCpG-mcs	Invivogen	hEF1	Zeocina
pCpG/GK		hEF1	Zeocina
pCpG/GK _{A456V}		hEF1	Zeocina
pCMV-sport6/GKRP	Open Biosystems	CMV	Ampicil·lina
pEGFP-N1	BD Biosciences Clontech	CMV	Kanamicina

2. MANIPULACIÓ DE BACTERIS

2.1 Soques bacterianes

Per als plasmidis PEPCK/GK, pBluescript[®] II SK (+/-), pCAGGs, pCAGGs/GK, pCAGGs/GK_{A456V} i pEGFP-N1, s'ha emprat la soca *Escherichia coli* XL1-blue com a portadora. El medi adequat per al creixement d'aquests bacteris és LB comú.

Els plasmidis pCpG-mcs, pCpG/GK, pCpG/GK_{A456V} tenen R6K gamma com a origen de replicació procariota de manera que només poden ésser amplificats en una soca d'*E. Coli* que expressi un gen pir mutant. És el cas de la soca d' *E. Coli* GT115 la qual a més no realitza metilacions Dcm. Aquest tipus de bacteris s'amplifiquen en medi LB modificat, amb una menor concentració de sals.

Cal manipular els bacteris en condicions d'esterilitat (sota flama o campana de flux laminar). El material de vidre i els medis de cultius (LB o LB-agar) s'esterilitzen per autoclau.

2.2 Creixement líquid/sòlid

Material:

Medi de cultiu LB

	LB líquid	LB líquid modificat	LB-agar	LB-agar modificat
NaCl	10g/l	5 g/l	10 g/l	5 g/l
Triptona-peptona	10 g/l	10 g/l	10 g/l	10 g/l
Extracte de llevat	5 g/l	5 g/l	5 g/l	5 g/l
Agar			15 g/l	15 g/l

S'autoclava. Pel què fa a l'LB-agar, també s'autoclava i quan es comenci a refredar cal plaquejar-lo en plaques de Petri (aproximadament 20 ml per placa) on solidificarà.

Antibiòtic de selecció	Concentració en cultiu
Ampicil·lina	50 µg/ml
Kanamicina	30 µg/ml
Zeocina	25 µg/ml

Mètode

- En el cas del cultiu líquid, es fan créixer les cèl·lules en agitació (220rpm) amb medi LB a 37°C durant tota la nit (12-16h). Per assegurar un creixement exponencial del cultiu cal una bona oxigenació, de manera que el recipient on es faci el cultiu no es pot omplir més d'una tercera part. Per a mini-cultius analítics s'empren tubs de 15 ml amb un volum de cultiu de 3ml; pels cultius preparatius s'usen *Erlenmeyers*. En el cas que les cèl·lules hagin estat prèviament transformades amb un plasmidi, s'afegirà antibiòtic al medi de cultiu per tal d'exercir una pressió selectiva i afavorir el creixement de les cèl·lules que hagin incorporat el plasmidi. S'utilitzarà un o altre antibiòtic segons la resistència codificada pel plasmidi.
- En el cas de cultius sòlids, es faran servir plaques de LB-agar amb l'antibiòtic d'elecció. Les plaques s'incuben durant tota la nit a 37°C. És important deixar-les de cap per avall per tal d'evitar que el vapor d'aigua condensat caigui sobre el medi de cultiu.

2.3 Preparació de cèl·lules competents

Mitjançant un tractament amb CaCl₂ s'indueixen porus a la paret bacteriana. Els bacteris obtinguts s'anomenen competents perquè poden internalitzar DNA plasmídic.

Material

LB

Solució de CaCl₂ (dihidratat) 50mM (estèril per autoclau o filtrat)

Glicerol estèril

Mètode:

1. Inocular cèl·lules d'*Escherichia coli* provinents d'un estoc de glicerol mare sobre 2 ml de LB sense antibiòtic i deixar-les créixer durant tota la nit a 37°C en agitació(220 rpm).
2. El matí següent, abocar el mini-cultiu a un *Erlenmeyer* d'1 litre de capacitat que contingui 300 ml de LB sense antibiòtic i es deixa créixer a 37°C en agitació.
3. Per seguir el creixement bacterià, cada 30 minuts s'extreu una alíquota del cultiu i en mesurem l'absorbància a 590-600 nm. Quan l'absorbància és de 0.35-0.60 el cultiu està en fase de creixement exponencial i aturarem el cultiu.
4. Es refreda el creixement durant mínim 15 minuts a 4°C. Un cop refredat es reparteix el cultiu en tubs de 50 ml (també pre-refredats). A partir d'aquest punt, es realitza tot el tractament a 4°C amb les solucions i el material pre-refredats a la nevera per millorar la supervivència de les cèl·lules.
5. Es centrifuga el cultiu a 1500 rpm durant 10 minuts a 4°C i es descarta el sobrenedant.
6. Es resuspèn el precipitat obtingut en 25 ml de la solució de CaCl₂ i es deixa en gel durant 30 minuts.
7. Es centrifuga el cultiu a 1500 rpm durant 10 minuts a 4°C i es descarta el sobrenedant.
8. Es resuspèn el precipitat bacterià en 10 ml de la solució de CaCl₂.
9. Es centrifuga el cultiu a 1500 rpm durant 10 minuts a 4°C i es descarta el sobrenedant.

10. Es resuspèn el precipitat bacterià en 2 ml de solució de de CaCl_2 .
11. S'ajunten tots els vials en un i s'afegeix la quantitat de glicerol adequada per tenir una concentració final del 20%.
12. S'aliquota el més ràpid possible en fraccions de 200-500 μl i es congelen immediatament en nitrogen líquid. Es conserven a -80°C .

2.4 Transformació de cèl·lules competents per xoc tèrmic.

La transformació és un procés que permet introduir plasmidis o productes de la barreja de lligació en cèl·lules competents d' *Escherichia coli*. El plasmidi es mantindrà de forma episomal i s'amplificarà en les successives replicacions bacterianes. D'aquesta manera es poden obtenir grans quantitats del DNA plasmídic clonat.

Material

Cèl·lules competents

Medi LB líquid

Plaques amb LB-agar amb l'antibiòtic de selecció

Mètode

1. Es descongela en gel una alíquota de cèl·lules competents
2. S'afegeixen uns 50 ng del plasmidi que es vol transformar (en cas que provingui d'una lligació s'afegirà 5 μl) en 100 μl de cèl·lules competents i s'agita suaument.
3. Es realitza el xoc tèrmic:
 - 20 minuts en gel
 - 45 segons a 42°C (bloc sec)
 - 2 minuts en gel
4. S'afegeixen 900 μl de medi LB sense antibiòtic. Es deixa en agitació durant 45 minuts a 37°C per permetre que les cèl·lules es recuperin del xoc tèrmic.
5. Es centrifuguen durant 2 minuts a 3000 rpm per baixar les cèl·lules i decantem el sobrenedant fins que quedin uns 50 μl .
6. Es resuspèn el contingut de cèl·lules amb el volum residual de LB i es plaquegen plaques de LB-agar amb l'antibiòtic de selecció adient (prèviament atemperades). Es cultiven de cap per avall durant tota la nit a 37°C . Aquelles cèl·lules que hagin adquirit el DNA plasmídic amb el gen de resistència corresponent podran créixer i generar colònies, mentre que les no l'hagin incorporat moriran.

2.5 Preparació d'estocs de glicerol

Es preparen estocs de glicerol per conservar els bacteris que han incorporat les construccions plasmídiques i, a partir d'ells, es podrà amplificar el clon quan sigui necessari.

Material

Cultiu bacterià transformat amb el plasmidi d'interès

Glicerol 80% (v/v) estèril

Medi LB líquid

Mètode

Es prenen 810 μl de cultiu bacterià en fase de creixement exponencial en medi LB (durant 12-16 h a 37°C en agitació) i s'hi afegeixen 190 μl de glicerol 80% (el percentatge final de glicerol és 15%). Agitar bé per inversió i guardar a -80°C .

3. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE DNA

3.1 Preparació de DNA plasmídic a petita escala (Miniprep) i a gran escala (Maxiprep i Megaprep)

La **miniprep** és un protocol d'extracció del DNA plasmídic d'un cultiu bacterià. S'acostuma a utilitzar després d'una lligació per a comprovar, mitjançant digestió amb enzims de restricció, que s'ha obtingut el plasmidi d'interès. El mètode més comú de miniprep consisteix en trencar les cèl·lules del cultiu mitjançant un xoc alcalí. En aquestes condicions només el DNA circular, com és el DNA plasmídic, queda en solució i es pot separar del genòmic. Existeixen nombrosos kits que permeten fer aquest procés de manera ràpida i fàcil. Per desenvolupar aquest tesi s'ha usat tant el protocol clàssic d'extracció com el kit Wizard®plus minipreps (Promega).

Material (pel protocol clàssic):

Cultiu bacterià transformat amb el plasmidi d'interès.

SOLUCIÓ P1	SOLUCIÓ P2	SOLUCIÓ P3
Glucosa 50 mM Tris-HCl 25 mM pH 8.0 EDTA 10 mM RNAsa 100 µg/ml	NaOH 0.2 N SDS 1% (p/v)	KAc 3 M pH 5.5

Solució de fenol-cloroform : 25 ml fenol – 24 ml cloroform – 1 ml isoamil-alcohol ; un cop preparada cal afegir Tris 10 mM a sobre per evitar l'oxidació del fenol-cloroform. Conservar-lo a la foscor.

Preparació del fenol:

1. Es fonen 250 g de fenol al bany maria (aproximadament a 55°C)
2. Afegir 30 ml de Tris-HCl 1M pH 7.5
3. Afegir 62.5 ml d'aigua
4. Afegir 300 mg 8-hidroxiquinoleïna (és un antioxidant)
5. Agitar i guardar-ho tota la nit a 4°C

Solució d'etanol 70%

Mètode (pel protocol clàssic)

1. Passar a un eppendorf 1,5 ml de cultiu líquid (LB + antibiòtic) crescut a 37°C durant la nit
2. Centrifugar a 16.000 g durant 3 min a temperatura ambient per precipitar els bacteris. Eliminem el sobrenedant.
3. Resuspendre el pellet amb 200 µl de solució P1+RNAsa
4. Vortejar els eppendorfs i deixar-los durant 5 min a temperatura ambient i seguidament 5 min en gel
5. Afegir 400 µl de solució P2 (preparada al moment). És important barrejar bé per inversió (4-6 vegades) i deixar-los en gel durant 5 minuts (és important que aquest pas no superi els 5 minuts de durada)
6. Afegir 300 µl de solució P3 freda. És important barrejar bé i tot seguit es deixa reposar un mínim de 10 min en gel
7. Centrifugar a 16.000 g durant 7 min a temperatura ambient. Recuperem el sobrenedant i el passem, el més net possible, a un altre eppendorf
8. Afegir, sota campana d'extracció, 500 µl de solució fenol-cloroform i vortejar bé, que quedi ben mesclat

9. Centrifugar a 16.000 g durant 2 minuts. Recuperem la fase superior (part aquosa) i la passem, el més net possible, a un altre eppendorf
10. Afegir 0.7 V d'isopropanol i barrejar bé per inversió.
11. Centrifugar a 16.000 g durant 10 min. Descartem el sobrenedant per decantació
12. Afegir 500 µl d'etanol 70% fred per tal de rentar el pellet
13. Centrifugar a 16.000 g durant 5 min. Descartem el sobrenedant per decantació
14. Fem un pols de centrífuga per fer baixar l'etanol i amb una pipeta Pasteur n'eliminem les restes
15. Assequem el pellet a temperatura ambient durant 5-10 min (en assecar-se esdevé transparent)
16. Resuspendre el pellet en 50 - 100 µl d'aigua mQ

NOTA: Els passos 8 i 9 amb fenol-cloroform permeten desproteïnitzar el DNA aprofitant les propietats hidrofòbiques de les proteïnes, que tenen afinitat pels dissolvents orgànics. Aquests passos són prescindibles quan fem minipreps rutinàries de comprovació de lligació. Només s'aconsellen per obtenir DNA molt net per a seqüenciació.

La **Maxiprep** i la **Megaprep** permeten obtenir quantitats elevades de DNA per al seu ús en experiments de transfecció en cultiu cel·lular *in vitro* o per a la injecció d'animals *in vivo*. Es parteix d'un cultiu de 150-500 ml i s'utilitza el kit de maxi-prep (proporciona un rendiment de fins a 500 µg de DNA plasmídic) o mega-prep (proporciona un rendiment de fins a 2 mg de DNA plasmídic) segons les indicacions del Kit. S'han usat els kits comercials *GenElute Endotoxin-free Maxiprep plasmid Purification Kit* (Sigma) o *Nucleobond Endotoxin-free Plasmid DNA Purification kit* (Macherey-Nagel). S'han escollit aquests kits perquè permeten l'obtenció de DNA plasmídic lliure d'endotoxines. La presència d'endotoxines en les preparacions plasmídiques promou reaccions inflamatòries *in vivo* que tenen com a resultat la inhibició de l'expressió del plasmidi.

Anàlisi del DNA obtingut

Per a la valoració de la concentració i la puresa del DNA plasmídic es mesuren les absorbàncies a λ 260 nm i 280 nm d'una dilució 1/50 i es calcula la concentració segons la fórmula:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} * 50 * \text{factor de dilució}$$

La puresa s'estima segons la relació A_{260}/A_{280} . Una solució pura de DNA té una A_{260}/A_{280} entre 1.8 i 2. Relacions inferiors són indicatives de contaminació per proteïnes o substàncies aromàtiques (per exemple, fenol). Relacions superiors poden ser degudes a contaminació per RNA.

3.2 Manipulació enzimàtica del DNA

Les endonucleases de restricció són enzims purificats de bacteris o de fongs, que reconeixen seqüències específiques de DNA i en trenquen l'enllaç fosfodièster de manera que tallen la cadena de DNA. L'activitat dels enzims de restricció depèn del pH, de la força iònica i de la temperatura de la reacció. Cada enzim té unes condicions òptimes de funcionament.

Normalment, la quantitat de DNA utilitzada en les digestions oscil·la entre 0.5 i 10 µg, s'afegeixen de 1 a 10 unitats d'enzim per cada µg de DNA i es deixa digerir durant un període d'1 a 3 hores a 37°C. S'ha de tenir en compte que la quantitat d'enzim no pot superar mai el 10% del volum total de la reacció, ja que els enzims de restricció venen subministrats en una dissolució de glicerol al 50%, i una concentració de glicerol al medi de reacció superior al 5% pot fer perdre l'especificitat de reconeixement i comprometre l'activitat enzimàtica.

3.3 Electroforesi de DNA en gels d'agarosa

Per a la separació analítica o preparativa de fragments de DNA de mida superior a 100 pb les mostres de DNA s'han sotmès a electroforesi en gels d'agarosa en tampó TAE 1X. El percentatge d'agarosa del gel (0.75 - 2%) dependrà de la mida dels fragments de DNA que volem visualitzar (a menor mida de fragment, major percentatge d'agarosa). Habitualment es preparen els gels d'agarosa a l'1%.

Material

Agarosa

Bromur d'etidi 10 mg/ml

TAE 1X (preparat a partir d'un estoc 50X)

Tampó de càrrega

TAE 50X	Tampó de càrrega
Tris 40 mM (200g/L)	Glicerol 50% (vol/vol)
Àcid acètic 20 mM (57.1 ml acètic glacial)	EDTA 100 Mm
EDTA 1 mM (100 ml EDTA 0.5 M)	SDS 1% (vol/vol)
S'autoclava	Blau de bromofenol 0.1% (p/vol)
	Xilen Cianol FF 0.1% (p/vol)

Mètode

Per a la preparació del gel cal dissoldre l'agarosa en TAE 1X aplicant calor (amb un microones). Quan s'hagi atemperat s'afegeix una gota de BrEt per tenir concentració final de 0.5 – 1 µg/ml. Tot seguit s'aboca al suport del gel, s'hi posa una pinta per tal de formar pouets quan solidifiqui l'agarosa. Un cop solidificada, es posa dins la cubeta d'electroforesi i es cobreix totalment amb TAE 1X.

La mostra de DNA es prepara amb tampó de càrrega 1X i es carrega als pouets del gel. El DNA es sotmet a electroforesi a 90V durant 30-60 minuts, fins que el front (blau de bromofenol) arriba al final del gel. La visualització del DNA s'aconsegueix mitjançant la incorporació al gel del colorant fluorescent bromur d'etidi (0.5 µg/ml), que s'intercala entre les cadenes de DNA i apareix com una banda de color taronja quan és sotmès a il·luminació ultraviolada. Aquesta tècnica permet detectar quantitats de fins a 10ng de DNA.

3.4 Aïllament i purificació de fragments de DNA

Per a la purificació de fragments de DNA en gels d'agarosa s'ha utilitzat el kit Quiaquick *Gel Extraction* (Quiagen) basat en la dissolució en un agent caotrópic del fragment d'agarosa que conté la banda desitjada. Aquestes condicions permeten una adsorció selectiva del DNA a una matriu de sílice. El DNA posteriorment es renta i s'elueix en condicions de baixa força iònica, normalment aigua. Es va seguir el protocol proporcionat pels subministradors.

3.5 Construcció de molècules híbrides de DNA: Lligació

La lligació permet insertar fragments de DNA en vectors plasmídics. Es parteix de fragments de DNA digerits amb l'enzim o enzims de restricció adequats per tal de tenir els mateixos extrems cohesius o, quan no sigui possible, extrems roms. En els dos casos cal defosforilar els extrems 5' del vector per evitar la seva recircularització.

3.5.1 Producció d'extrems roms

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

Material i mètode

Barreja de reacció :

- 4 µl de tampó de reacció 5X
- 1 µg de DNA digerit
- 1 µl de dNTP 2 mM (la concentració final serà 0.1 mM)
- 1 U de T4 DNA polimerasa (Fermentas)
- Afegir aigua mQ fins arribar a un volum final de 20 µl

S'incuba la barreja durant 20 minuts a 11°C i s'atura la reacció escalfant a 75°C durant 10 minuts. Es pot congelar el resultat a -20°C.

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

3.5.2. Defosforilació d'extrems 5' del DNA

Per a la defosforilació dels extrems 5' del DNA s'usa la fosfatasa alcalina de vedella (CIAP), la qual catalitza la hidròlisi de residus 5'-fosfats de DNA, RNA i ribo- i deoxiribonucleòsids trifosfats.

Material i mètode

- 1 – 20 pmols d'extrems de DNA dissolts en un volum de 10-40 µl d'aigua mQ
- 5 µl de tampó de reacció 10X (Fermentas)
- 1 U/µl de fosfatasa alcalina (CIAP de Fermentas)
- Afegir aigua mQ fins arribar a un volum final de 50 µl

S'incuba la barreja de reacció a 37°C durant 30 minuts. S'atura la reacció escalfant a 85°C durant 15 minuts. El resultat de la defosforilació es pot conservar a -20°C.

NOTA: El tractament amb CIAP pot fer-se directament després de digerir el DNA amb els enzims de restricció sense passar per la purificació.

Es recomana usar 0.05 unitats de CIAP per a defosforilar 1 pmol d'extrem de DNA, però s'acostuma a posar CIAP en excés, 2X o 3X.

Càlcul dels pmols d'extrems:

* per a una molècula circular (plasmidi)

$$\text{pmol extrems} / \mu\text{g DNA} = (2 N * 10^6) / (l * 649)$$

* per a una molècula linial (insert)

$$\text{pmol extrems} / \mu\text{g DNA} = (2 (N+1) * 10^6) / (l * 649)$$

on N és el nombre de dianes de restricció per fragment i l és la longitud de la molècula en pb.

3.5.3 Lligació

Un cop tenim els fragments de DNA purificats i els vectors defosforilats, es barregen a diferents proporcions molars insert:vector (1:1, 1:3, 3:1) i es tracten amb la DNA lligasa de T4, que catalitza la formació d'enllaços fosfodièster entre els extrems 3'OH i 5'P adjacents. També s'usa la proporció 1:0 com a control de la lligació ja que permet tenir idea de si hi ha hagut relligació del vector.

Material i mètode

Per a les lligacions s'utilitzen 50 ng de plasmidi i a partir de la fórmula presentada a continuació es pot saber quina és la proporció de massa entre plasmidi i insert, de manera que ens permet deduir els ng d'insert que calen.

$$\text{ng}_{\text{insert}} = (\text{ng}_{\text{vector}} * \text{pb}_{\text{insert}}) / \text{pb}_{\text{vector}}$$

Barreja de reacció:

1:0	1:1	1:3	3:1
50 ng plasmidi	50 ng plasmidi	50 ng plasmidi	150 ng plasmidi
	X ng d'insert	3X ng d'insert	X ng d'insert
1 µl de tampó 10X	1 µl de tampó 10X	1 µl de tampó 10X	1 µl de tampó 10X
1 µl T4 DNA lligasa	1 µl T4 DNA lligasa	1 µl T4 DNA lligasa	1 µl T4 DNA lligasa
Aigua fins a 10 µl	Aigua fins a 10 µl	Aigua fins a 10 µl	Aigua fins a 10 µl

- La reacció s'incuba durant 1 hora a temperatura ambient, seguit d'una incubació a 4°C durant la nit.
- El dia següent, es procedeix a la transformació de 5 µl de la barreja de lligació en la soca convenient de bacteris competents i es deixa créixer a 37°C durant tota la nit.
- El dia següent, es comprova l'aparició de colònies a la placa. Per verificar que els bacteris han incorporat la construcció plasmídica correcta, s'inoculen en un mini-cultiu de 3ml LB-líquid amb l'antibiòtic de selecció. Es deixa créixer a 37°C en agitació durant la nit.
- El dia següent s'extreu el DNA plasmídica, es digereix amb enzims de restricció i s'analitza el patró de bandes obtingut en un gel d'agarosa. És convenient guardar estocs de glicerol dels clons positius, per poder amplificar el plasmidi d'interès a partir d'ells.

3.6. Mutagènesi dirigida

La mutagènesi dirigida és una tècnica que utilitza la PCR (reacció en cadena de la polimerasa) per introduir mutacions puntuals, insercions o delecions sobre seqüències de DNA. Hem utilitzat el QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) per obtenir el cDNA de la GK_{A456V}. El canvi nucleotídic d'una timina per una citosina a la posició 1370 del cDNA de GK produeix el canvi aminoacídica d'una valina per una alanina al codó 456 de la proteïna GK. Per a la mutagènesi dirigida cal tenir un vector de doble cadena (motllo) que tingui l'insert d'interès i dos oligonucleòtids (*primers*) que tinguin la mutació desitjada. S'utilitza la tècnica de PCR i l'enzim Pfu DNA polimerasa que té més fidelitat de còpia que la tradicional Taq DNA polimerasa. Després dels cicles de temperatura, cal digerir el DNA no mutat (motllo) mitjançant d'enzim Dpn I endonucleasa. Aquest enzim permet destruir el DNA metilat i hemimetilat (seqüència diana 5'-Gm6ATC-3') provinent de soques d'*E.coli* i deixa intacte el DNA no metilat generat en la PCR. El DNA mutat contindrà un nick que haurà de ser reparat en les cèl·lules Epicurian Coli® XL1-Blue supercompetents.

3.6.1 Disseny d'oligonucleòtids per a mutagènesi dirigida

Els oligonucleòtids usats en aquest treball han estat sintetitzats per ARK Scientific (Ecogen) i compleixen els següents criteris suggerits pel kit de mutagènesi:

- Els dos oligos han de tenir la mutació i anellar-se a la mateixa seqüència però en cadenes oposades del plasmidi.
- Els oligos han de tenir una mida d'entre 25-45 pb i una T_m de ≥ 78°C.

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\% GC) - 675/N - \% \text{ desparellament}$$
on N és la mida de l'oligo en bases
(% GC i % desparellament són nombres sencers)
- La mutació ha d'estar al mig de l'oligo i amb 10-15 bases de seqüència correcta a cada banda.
- Els oligos han de tenir un %GC del 40% i haurien d'acabar en una o més G o C.
- Convé que els oligos s'hagin purificat per cromatografia o PAGE i que estiguin en excés.

Oligonucleòtids :






3'CTGGTCTCTGCGGcGGCCTGCAAGAAG'5

5'GACCAGAGACGCCgCCGGTCAAGAACG3'.

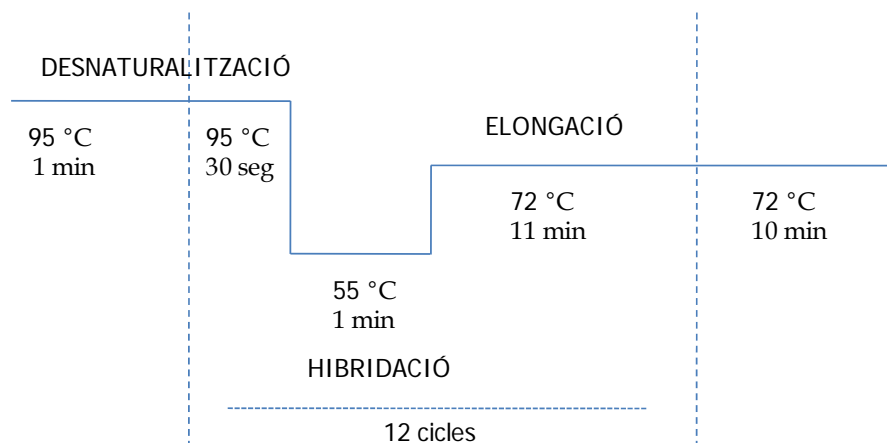
3.6.2 PCR per a mutagènesi dirigida

S'ha seguit el protocol del Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) per a la introducció de mutacions puntuals.

Barreja de reacció:

	 Ctrol -Pfu	 Ctrol-DNA	 DNA 20	 DNA 50	 DNA 100
Tampó de reacció 10X	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
dNTP's	1 µl (25mM)	1 µl (25mM)	1 µl (25mM)	1 µl (25mM)	1 µl (25mM)
Oligo 5'	125 ng	125 ng	125 ng	125 ng	125 ng
Oligo 3'	125 ng	125 ng	125 ng	125 ng	125 ng
Pfu	-	1µl (2.5U/µl)	1µl(2.5U/µl)	1µl (2.5 U/µl)	1µl (2.5 U/µl)
DNA	100 ng	-	20 ng	50 ng	100 ng
Aigua mQ	Fins a 50µl	Fins a 50µl	Fins a 50µl	Fins a 50µl	Fins a 50µl

Cicles de temperatura:



NOTA: El temps d'elongació varia segons la longitud del DNA que s'ha d'amplificar. Es calcula tenint en compte que l'amplificació dura 2 minuts per cada Kb de DNA.

- El producte de PCR es digereix amb Dpn I. Per cada 10 µl de reacció s'afegeix 1 µl d'enzim Dpn I (10 U/µl). S'incuba a 37°C durant un mínim d'1 hora.
- A continuació es transformen 5 µl del resultat de la digestió en cèl·lules Epicurian Coli XL1-blue.
- El dia següent es piquen les colònies d'interès i es fan créixer en un minicultiu d'LB amb l'antibiòtic de selecció.
- El dia següent es fa una miniprep per obtenir el plasmidi i es comprova si hi ha la mutació incorporada mitjançant seqüenciació de DNA.

3.7 Seqüenciació de DNA

S'ha utilitzat una tècnica de seqüenciació de DNA basada en el mètode de Sanger (1978). Aquest mètode utilitza DNA de cadena senzilla, DNA polimerasa i barreja de desoxinucleòtids (dNTP) i didesoxinucleòtids (ddNTP). Els ddNTP no tenen un dels grups hidroxil; per tant, es podran incorporar a la cadena però no permetran formar un enllaç amb el següent nucleòtid de manera que provocarà una aturada en la polimerització. La incorporació de ddNTP es donarà a l'atzar i permetrà obtenir una barreja de fragments de DNA de mida diferent, de totes les mides possibles per a un DNA d'una mida determinada. Els ddNTP poden estar marcats per fluorescència. En resoldre els fragments de DNA marcats en un gel es pot deduir la seqüència nucleotídica.

Material:

ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin Elmer
Columnes de sefarosa G-50, Amersham Pharmacia

Speed-vac

Mètode:

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

3.8 Purificació de DNA

En els experiments *in vivo* s'ha injectat directament el plasmidi obtingut amb els kits *GenElute Endotoxin-free Maxiprep plasmid Purification Kit* (Sigma) o *Nucleobond Endotoxin-free Plasmid DNA Purification kit* (Macherey-Nagel). Ara bé, en alguns casos s'ha injectat el plasmidi linealitzat perquè s'ha demostrat que la linealització millora la resistència del DNA a les nucleases i, per tant, prolonga l'expressió del transgen. Un cop el plasmidi ha estat digerit amb l'enzim o enzims de restricció corresponents, cal purificar el DNA per eliminar-ne les proteïnes i el tampó de digestió. S'han seguit dos protocols de purificació que es basen en la precipitació del DNA.

3.8.1 Mètode d'extracció orgànic amb fenol-cloroform

Aquest mètode és clàssic, ara bé és més tòxic perquè conté fenol. L'inconvenient és que no sempre es recupera tot el DNA i cal anar amb molt de compte que no quedin restes de fenol ni de cloroform.

Material

Isopropanol
Fenol-cloroform-isoamilalcohol (25:24:1)
Etanol 70%

Mètode

1. Afegir 1 V de fenol-cloroform-isoamilalcohol
2. Centrifugar durant 2 min a velocitat màxima (16.000 g), recuperar la fase superior en un altre tub
3. Repetir els passos 1 i 2
4. Afegir 1 V de cloroform
5. Centrifugar durant 2 min a velocitat màxima, recuperar la fase superior en un altre tub
6. Repetir el passos 4 i 5
7. Afegir 0.7 V d'isopropanol

8. Centrifugar durant 10 min a velocitat màxima i eliminar el sobrenedant
9. Resuspendre el sobrenedant en 1 V d'etanol 70% (per tal de rentar el pellet)
10. Centrifugar durant 5 min a velocitat màxima i eliminar el sobrenedant
11. Assecar a l'speed-vac el temps necessari
12. Resuspendre en el volum desitjat d'aigua mQ durant el temps necessari (o/n a 4°C)

NOTA: Si inicialment partim d'un volum molt gran de digestió, podem fer un pas previ de precipitació del DNA abans de tractar-lo amb fenol-cloroform. En aquest cas afegiríem 0.7 V d'isopropanol, ho centrifugaríem durant 10 minuts a velocitat màxima i descartaríem el sobrenedant. Assecaríem el pellet a l'speed-vac durant el temps necessari i rehidrataríem amb el volum desitjat d'aigua mQ (es recomana 700 µl si treballem en eppendorfs).

3.8.2 Mètode d'extracció inorgànic per "salting-out"

Es tracta d'un mètode més ràpid, fàcil i barat que permet obtenir DNA d'elevada qualitat.

Material

Solució NaCl 5M

Fenol-cloroform-isoamilalcohol (25:24:1)

Etanol 70%

Mètode

1. Afegir el volum de NaCl necessari per tenir una concentració de 2M
2. Vortejar vigorosament durant 15 segons
3. Deixar el tub en gel durant 1 hora, 30 minuts al congelador i després en gel una estona
4. Centrifugar a velocitat màxima (16.000g) durant 30 min (si convé es pot transferir el sobrenedant a un altre tub i recentrifugar-lo 15 min).
5. Recollir el sobrenedant
6. Afegir 0.7 V d'isopropanol (si el DNA està molt diluït, en 1V d'isopropanol)
7. Barrejar bé per inversió
8. Centrifugar 15 min a velocitat màxima
9. Rentar el pellet amb etanol 70% (1volum)
10. Centrifugar a velocitat màxima durant 5 min
11. Assecar el pellet
12. Resuspendre'l en el volum desitjant d'aigua

4. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE RNA

La preparació d'RNA total s'ha realitzat a partir de teixit congelat immediatament després de la seva extracció en nitrogen líquid i posteriorment mantingut a -80°C. Durant la purificació, la manipulació de l'RNA s'ha fet en fred (treballant sobre gel), amb material autoclavat i aigua tractada amb DEPC (*diethyl pyrocarbonate*) per eliminar la possibilitat de degradació per RNAses.

Tractament d'aigua miliQ amb DEPC

S'afegeix un 0.1% (v/v) de DEPC a aigua bidestil·lada (mQ) i es manté 12 h a 37°C en un bany. Posteriorment s'ha d'autoclavar.

Advertiments:

- Com que el DEPC es descompon amb facilitat, un cop encetat és aconsellable gastar d'un sol cop tot el pot (5ml de DEPC en 5 litres d'aigua).
- Manipular el DEPC en una campana d'extracció de gasos, ja que és perillós.

Per a l'extracció de l'RNA total de múscul, es va homogeneïtzar la mostra en un polítró *Polytron PT3000* (Kinematica) aplicant-hi 2 polsos de 10 segons a 10.000 rpm en 1 ml de *Ultraspec* (Biotex), seguint les indicacions del fabricant. Per altra banda, s'ha extret l'RNA del teixit adipós i del fetge amb el *RNAeasy mini Kit* (Quiagen) que proporciona un RNA de gran puresa tot i tenir un menor rendiment. En aquest cas, una peça d'uns 10-20 mg es va homogeneïtzar en un *Potter* (Bayer) aplicant-hi 2 polsos de 10 segons a 1500 rpm en 600 µl de tampó RLT, i es van seguir les indicacions del kit. Addicionalment es va realitzar un tractament en columna amb DNasa, seguint les indicacions del kit, per evitar possibles contaminacions amb el DNA plasmídic que poguessin interferir en la quantificació del mRNA.

4.1 Anàlisi del RNA obtingut

Per a la valoració de la concentració i la puresa del RNA es mesuren les absorbàncies a λ 260 nm i 280 nm d'una dilució 1/50 i es calcula la concentració segons la fórmula:

$$[\text{RNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} * 40 * \text{factor de dilució}$$

La puresa de la preparació de RNA es valora segons la relació A_{260}/A_{280} . Una solució pura de RNA té una $A_{260}/A_{280} \geq 2$. Relacions inferiors són indicatives de contaminació per proteïnes o substàncies aromàtiques (per exemple, fenol). Relacions superiors poden ser degudes a degradació del RNA.

Per altra banda, la integritat del RNA es comprova per electroforesi en un gel desnaturalitzant d'agarosa a l' 1 %. Si el RNA no presenta degradació significativa, es poden diferenciar dues bandes definides corresponents al RNA ribosòmic 28S (4.8 Kb) i 18S (1.8 Kb)

4.1.1 Electroforesi de RNA en un gel de MOPS

Material

Agarosa

MOPS

Aigua DEPC

Formaldehid

Mostres RNA

Tampó de RNA amb BrEt

Tampó de càrrega, LB 6X (60% glicerol, 60 mM EDTA)

MOPS 10X (500 ml)	Tampó de RNA amb BrEt
0.2 M MOPS (20.9 g) 50 mM Acetat Na (1.045 g) 5 mM EDTA (10 ml de EDTA 0.5 M) Ajustar el pH a 7.4 Autoclavar	129 µl MOPS 10X 226µl Formaldehid 645 µl Formamida 9 µl Bromur d'etidi Aigua mQ fins a 1.29 ml

Mètode:

Es prepara un gel d'agarosa a l'1 % en MOPS 1X i també es preparen les mostres en tampó amb BrEt.

Gel d'agarosa 1% en MOPS (50 ml)	Preparació de mostres de RNA
0.5 g d'agarosa 36 ml aigua mQ Escalfar-ho per dissoldre l'agarosa i atemperar 5 ml de MOPS 10X 9 ml de Formaldehid	2 µl RNA 1.6 µl tampó de RNA amb BrEt 1.6 µl LB 6X 4.8 µl aigua DEPC Volum final: 10 µl S'escalfen les mostres durant 10 minuts a 65°C (per eliminar les estructures secundàries). Es deixen atemperar en gel durant 2 minuts.

Un cop preparats, es carrega la mostra de RNA als pouets del gel. Es sotmet a electroforesi a 90 V durant 30 minuts, fins que el front (blau de bromofenol) hagi corregut prou en el gel. La visualització del RNA s'aconsegueix mitjançant el colorant fluorescent bromur d'etidi el qual apareix de color taronja en ésser sotmès a il·luminació ultraviolada.

Alternativament, s'ha determinat la puresa i la quantitat de RNA a l'espectrofotòmetre Nanodrop NP-1000.

4.2. Anàlisi dels nivells de mRNA per PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR)

La qRT-PCR s'ha convertit en l'eina d'elecció per a quantificar el RNA missatger d'un gen determinat gràcies a la seva sensibilitat i dinamisme. El mètode es basa en la detecció de fluorocroms lligats a les sondes simultània a l'amplificació, superant així les limitacions dels protocols de quantificació basats en la reacció de PCR a punt final. En aquest treball s'han emprat sondes *TaqMan*, les quals són oligonucleòtids de 18-22 pb que estan marcats amb fluorocroms en els seus dos extrems; normalment en 5' porten un fluorocrom *reporter* (reportador) i en el seu 3' porten un fluorocrom *quencher* (apagador). Aquestes sondes són complementàries a una de les dues cadenes de DNA que es generen a la PCR i, quan els dos fluorocroms que porta estan propers (de 3 a 30 bases), no emeten fluorescència ja que el *quencher* apaga l'emissor. Però durant l'elongació del producte de PCR, la Taq-polimerasa amb activitat 5' exonucleasa hidrolitza la sonda; llavors els fluorocroms *reporter* i *quencher* ja no són propers i es comença a detectar la fluorescència emesa pel *reporter*.

Gràcies a la fluorescència es pot seguir la cinètica exponencial de la reacció de PCR, fins que s'arriba a una saturació del senyal al punt final de la reacció. El número de còpies del cDNA a la reacció determina l'inici de la fase exponencial, fet que és aprofitat per estimar el contingut de mRNA de la mostra. Tot i que la tècnica permet la quantificació absoluta d'un determinat mRNA en termes de número de còpies (si es fa servir una recta patró), en la present tesi s'han determinat els valors relatius al tractament control.

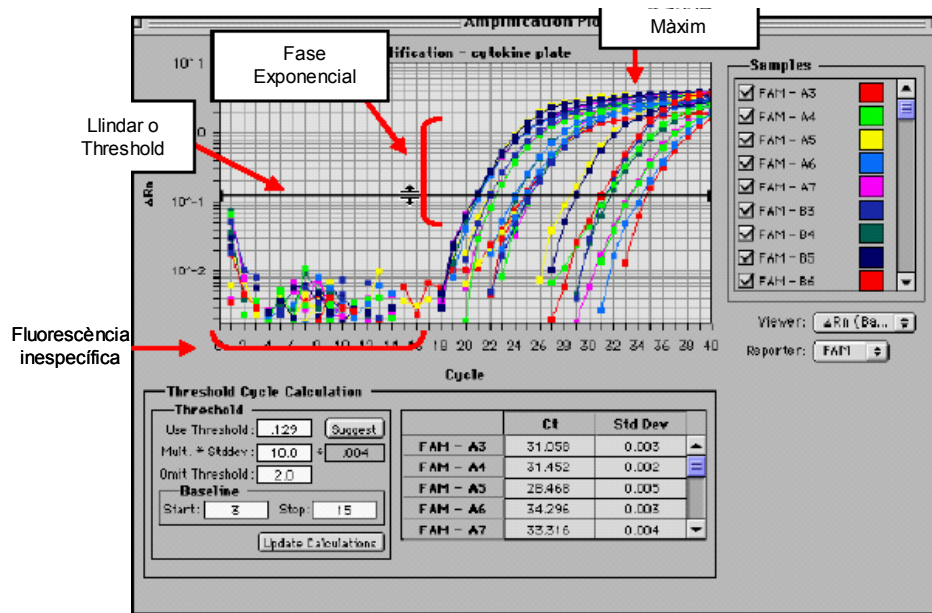


Figura 85. Imatge del seguiment de la fluorescència al llarg dels cicles de la qRT-PCR.

Per a l'amplificació dels mRNA calen dos passos: 1) en un pas previ, el mRNA es retrotranscriu a cDNA i 2) el cDNA s'amplifica en els successius cicles de PCR.

4.2.1 Obtenció de cDNA per retro-transcripció del mRNA

S'utilitza el kit comercial *Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads* (Amersham Biosciences). A partir de 2 µg de RNA (la quantitat recomanada és de l'ordre dels 100 ng – 5 µg de RNA total), amb hexàmers aleatoris com a encebadors i seguint el protocol del fabricant s'obté una població dels cDNAs corresponents al RNA total de la mostra.

4.2.2 PCR a temps real

Per a la quantificació del mRNA d'interès, s'ha amplificat 50 ng de RNA retrotranscrit a cada pou (la quantitat recomanada és de l'ordre dels 1-100 ng de RNA retrotranscrit), al qual s'ha afegit la sonda TaqMan d'interès i la solució *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems; conté el tampó adequat, la polimerasa i els nucleòtids). A part del gen d'interès, també cal quantificar un gen control per a normalitzar els resultats. En aquest treball s'ha usat el gen de la β_2 -microglobulina (Ref. Mm00437762_m1 d'Applied Biosystems) com a normalitzador, després d'haver comprovat que no varia en les condicions experimentals emprades.

Per a l'avaluació dels resultats s'ha emprat el mètode de quantificació del $\Delta\Delta Ct$. Abans d'usarlo, ha calgut comprovar que l'eficiència d'amplificació del gen diana és semblant a la del gen de referència (β_2 -microglobulina) tal i com s'indica en el *User Bulletin #2* del *ABI Prism 7700 Sequence Detection System*.

NOTA: A l'hora de quantificar la *Gck* de rata (sonda TaqMan ref. Rn00561265_m1 d'Applied Biosystems) vam pujar la temperatura de *melting* fins a 65°C, enlloc dels 60°C estàndard, per tal d'afavorir l'astrigència de la reacció i minimitzar l'amplificació del gen *Gck* endogen (ratolí).

4.2.3 PCR a temps real de múltiples gens

S'ha usat el sistema *Taqman Low Density Array* (Applied Biosystems) en un aparell *ABI PRISM HT7900 Real Time Sequence Detection System* (Applied Biosystems) per analitzar els nivells de mRNA de diversos gens alhora. El Taqman Low Density Array és una placa de 384 pous que conté les sondes *TaqMan* incorporades. Les plaques emprades en aquest estudi són d'una configuració 24x8x2, la qual permet amplificar 24 mRNAs de 8 mostres individuals per duplicat.

Proteïna	Gen	Sonda TaqMan
Chrebp	Mlxipl	Mm00498811_m1
c-myc	Myc	Mm00487803_m1
Glucocinasa	Gck	Mm00439129_m1
UCP 2	Ucp2	Mm00495907_m1
PFK2	Pfkfb3	Mm00504650_m1
Enzim màlic	Mod1	Mm00782380_s1
cMDH	Mdh1	Mm00485106_m1
PGC-1 α	Ppargc1a	Mm00447183_m1
HNF-4 α	Hnf5	Mm00433964_m1
PEPCK-C	Pck1	Mm00440636_m1
18S	4342379-18S	4342379-18S
B-2-m	B2m	Mm00437762_m1
GLUT-2	Slc2a2	Mm00446224_m1
CPT1	Cpt1a	Mm00550438_m1
PPAR δ	NULL	Mm00803186_g1
PPAR γ	Pparg	Mm00440945_m1
FAS	Fasn	MM00662319_m1
SREBP1c	Srebf1	Mm00550338_m1
G6Pc	G6pc	Mm00839363_m1
HmgCoA Sintasa	Hmgcs2	Mm00550050_m1
Glutamina sintetasa	Glul	Mm00725701_s1
PPAR α	Ppara	Mm00440939_m1
LXR α	Nr1h3	Mm00443454_m1
HNF3 γ	Foxa3	Mm00484714_m1

TÈCNIQUES DE CULTIU CEL·LULAR I EXPERIMENTS *IN VITRO*

1. Línies cel·lulars

En els experiments *in vitro* es va fer servir la línia cel·lular d'hepatoma humà **Huh7**, la qual és altament glucolítica com la majoria de les línies tumorals. Les cèl·lules Huh7 són permissives a la transfecció amb vectors catiónics i/o lipídics, fet que les converteix en una eina molt útil per a estudis de transferència gènica.

Medi de cultiu: DMEM (Dulbecco's Modified Medium Glutamax, de Biological Industries), suplementat amb 10% sèrum fetal boví (FBS, Biological Industries), 2mM glutamina, 100 U/ml penicil·lina i 100 µg/ml estreptomicina.

Condicions de creixement:

37°C en atmosfera al 5% CO₂.

Cal canviar el medi cada 2-3 dies

Quan arriben a 100% de confluència, cal tripsinitzar-les i passar-les a una dilució 1:5 – 1:10.

Criopreservació del cèl·lules

Les cèl·lules destinades a la criopreservació es cultiven en plaques de 10 cm fins assolir una confluència del 80-100%.

- S'aspira el medi de les plaques i es renten amb PBS estèril 1X.
- S'hi afegeix tripsina per tal de desenganxar les cèl·lules del plat. Es deixa actuar la tripsina durant un parell de minuts a 37 °C i , si les cèl·lules no es desenganxen, es pot colpejar suaument la placa pel cantell. S'atura l'acció de la tripsina mitjançant l'addició de 1-2 ml de medi complet, i es pipeteja per acabar de desenganxar les cèl·lules i trencar els possibles grumolls que s'hagin format.
- Es recullen les cèl·lules en un tub de tipus *Falcon* estèril i s'hi afegeix PBS 1X fins al volum final del Falcon per tal de diluir la tripsina.
- Es centrifuga el tub a 300 x g durant 5 minuts i descartem el sobrenedant.
- Es resuspèn el pellet de cèl·lules amb medi de criopreservació (es tracta del medi de manteniment complet suplementat amb FBS a una concentració final del 20% (v/v) i DMSO 10% (v/v). Cal seguir un ordre en la resuspensió: primer s'afegeix el sèrum i després s'afegeix gota a gota el medi + DMSO (s'afegeix gota a gota perquè el DMSO és tòxic).
- S'aliquota 1 ml a cada vial de preservació.
- Es refreden les cèl·lules amb un gradient aproximat d'1°C/min fins assolir -80°C. Finalment, es transfereixen els tubs de cèl·lules al criopreservador de nitrogen líquid.

Descongelació de cèl·lules

Per tal de minimitzar l'estrès, les cèl·lules s'han de descongelar ràpidament, però sense comprometre l'esterilitat del procediment. Si les cèl·lules no provenen de l'ATCC o alguna altra institució de reconegut prestigi, cal incubar-les en un incubador de quarantena fins que se sotmetin a l'assaig de detecció de micoplasmes.

- Previ a la descongelació, es preparen les plaques de cultiu de 10 cm de diàmetre amb 10 ml de medi complet escalfat a 37°C.
- Es submergeix i s'agita el vial de criopreservació que conté les cèl·lules que es volen descongelar en el bany d'aigua a 37 °C fins que el contingut es descongeli parcialment.

- Es submergeix el vial en etanol al 70 % (vol/vol) durant 30 s, i es deixa assecar durant 30 s més a l'interior de la cabina de flux laminar.
- S'aboca el contingut del vial a la placa de cultiu amb medi que teníem preparada, encara que no estigui totalment descongelat. S'agita suaument per tal de disseminar les cèl·lules per tota la placa de cultiu i es posa a l'incubador. (Alternativament podeu diluir el contingut del vial de criopreservació amb 10 ml de medi de cultiu, centrifugar-ho a $200 \times g$ durant 5 min a temperatura ambient, aspirar i descartar el sobrenedant, dispersar el sediment cel·lular amb medi de cultiu i transferir-ho a una placa de cultiu. D'aquesta manera es redueix el temps d'exposició de les cèl·lules al DMSO, però se sotmeten a l'estrès de la centrifugació.)
- Es van observant les cèl·lules a intervals d'1h amb el microscopi.
- Quan la major part de les cèl·lules s'hagin adherit, o al cap de 8 h (en casos excepcionals es pot esperar 24 h), aspireu el medi de les plaques i addicioneu el medi de cultiu corresponent a les cèl·lules. Aquest canvi de medi es duu a terme per eliminar el DMSO provenint del medi de criopreservació que hi ha al medi de cultiu, perquè pot ser tòxic per les cèl·lules si el temps d'exposició és llarg, malgrat que la concentració final només és 1 % (vol/vol).

2. Transfeccions

2.1 PEI

Les transfeccions rutinàries es realitzen amb PEI lineal 25 KDa (Aldrich, Cat#40.872-7).

En el moment de la transfecció les cèl·lules han d'estar en un 60% de confluència.

1. Preparació del medi de transfecció:
 - Calen 25 μ l de NaCl per cada μ g de DNA
 - Calen 5 μ l de PEI per cada μ g de DNA

Orientativament, per un plat de 10 cm es necessiten 15 μ g de DNA i 75 μ l de PEI.

2. Es procedeix a la mescla:
 - Tub A : Diluir el DNA en el volum adequat de NaCl 150 mM i es vorteja suaument
 - Tub B: Diluir el PEI 5.47 mM en el volum adequat de NaCl 150 mM i es vorteja suaument.
3. S'afegeix el contingut del tub B sobre el tub A i vortejar immediatament. És molt important no invertir l'ordre i ser el més sistemàtic possible en el procediment, per evitar variabilitat inter-experimental, ja que la mida i eficiència dels complexos resultants dependrà molt de les condicions d'agitació i incubació posteriors.
4. S'incuba la barreja durant 10 minuts a temperatura ambient.
5. Fer dos rentats de les cèl·lules amb OPTI-MEM (GIBCO-BRL) per tal d'eliminar el sèrum, el qual pot interferir en el procés de transfecció (cal tenir en compte que el medi OPTI-MEM no conté sèrum, ja que el sèrum pot interferir en la transfecció).
6. Posar el volum adequat d'OPTI-MEM al plat per tal que el volum de transfecció sigui la meitat del volum habitual de manteniment.
7. Afegir la mescla de DNA/NaCl + PEI/NaCl a cada placa i agitar suaument la placa per tal que la mescla es reparteixi homogèniament per tota la placa.
8. Incubar més o menys 4 hores (no més de 4 hores i mitja perquè si no la viabilitat de les cèl·lules disminueix molt)
9. Un cop passat aquest temps, hi ha dues opcions :

- retirar el medi de transfecció i afegir el volum de manteniment de **DMEM** (el qual conté sèrum) i deixar les plaques 48 hores a l'incubador.
- afegir directament el volum habitual de manteniment de de DMEM, després de 24 h d'incubació canviar el medi i esperar 24 h més.

2.2 Lipofectina (Invitrogen)

S'han seguit les instruccions del fabricant. Breument, s'han sembrat les cèl·lules per a què estiguin a un 40-60% de confluència al moment de la transfecció. Les quantitats de DNA i de lipofectina s'han ajustat per al tipus cel·lular; per a les cèl·lules HuH7 s'ha treballat amb la relació següent: per cada µg de DNA, 4 µl de lipofectina. Les barreges de transfecció s'han realitzat en medi OPTI-MEM (Gibco BRL). Les cèl·lules han estat incubades amb la barreja de reacció durant 16 h a 37°C en un incubador de CO₂; a continuació s'ha canviat el medi per medi de manteniment amb sèrum i l'anàlisi s'ha realitzat a les 48 h post-transfecció.

3. Aïllament i cultiu primari d'hepatòcits de rata

Aïllament

S'han utilitzat rates Sprague-Dawley mascles de pesos compresos entre els 150-250 g. Els animals s'alimenten amb lliure accés al menjar (dieta comú, Panlab tipus: 04) i a l'aigua. Les rates són sacrificades entre les 8 i les 11 h del matí.

Els hepatòcits es varen aïllar seguint el mètode inicialment descrit per Berry i Friend (1969), modificat posteriorment per Seglen (1973) i per Bartrons (1983). Aquest mètode es basa en la perfusió recirculant d'una solució de col·lagenasa que disgrega el teixit. A continuació es descriu el procés seguit:

1. Preparació del sistema: els medis de pre-perfusió i perfusió es mantenen a temperatura en un bany calefactor de manera que la temperatura del medi en sortir de la cànula sigui d'aproximadament 36-37°C (en el nostre sistema experimental s'aconsegueix aquesta temperatura d'entrada posant el bany a 42°C). Aquests medis es fan circular per tubs translúcids de silicona mitjançant una bomba peristàtica a una velocitat de 40-45 ml/min cap al serpentí termostatitzador situat a l'interior del bany; finalment el medi passa a través d'una columna d'oxigenació i entrarà a l'animal a través d'una cànula a la vena porta (a continuació es descriu el procés de canulació).
2. Preparació de l'animal: s'anestesia la rata via injecció intraperitoneal de ketamina-xilacina a una dosi de ketamina de 60 mg/Kg de pes corporal (Imalgene 1000 0.2 ml / 200g) i xilacina 6 mg/Kg. Un cop anestesiada, s'injecten 0.2 ml de solució d'heparina al 5% a la vena del penis. Es col·loca sobre la taula d'operacions i es ruixa l'abdomen amb etanol 70% per tal d'evitar possibles infeccions. Es retira la pell de l'abdomen, es desinfecta la zona amb una solució iodada i es realitza una laparotomia. És important retirar tanta pell com sigui possible, sense malmetre el diafragma, per facilitar la manipulació i evitar possibles contaminacions a l'hora de cultivar els hepatòcits *a posteriori*. A continuació, es prepara una lligadura (amb fil de sutura 2.0) a la vena porta (a) i una a la vena cava inferior a l'altura dels ronyons(e) (Figura 86).

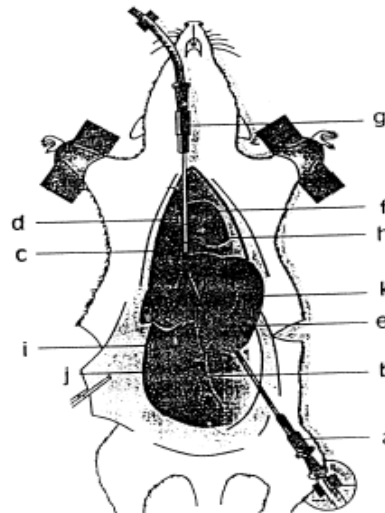


Figura 86. Esquema de la perfusió del fetge. (a) Cànula d'entrada al fetge (situada a la vena porta), (b) vena cava inferior seccionada, (c) cànula de sortida del fetge (localitzada a la vena cava superior), (d) aurícula dreta, (e) lligadura de la vena cava inferior, (f) cor, (g) cànula de sortida del fetge, (h) lligadura de la vena cava superior, (i) ronyó, (j) cavitat abdominal, (k) fetge.

3. S'inicia la circulació del medi de pre-perfusió pel circuit i es procedeix a la canulació.

Medi de pre-perfusió	Medi de perfusió
Hank's BSS (Sigma) 9.5 g/L HEPES 2.38 g/L EGTA 0.19 g/L NaHCO ₃ 0.35 g/L	Hank's BSS (Sigma) 9.5 g/L HEPES 2.38 g/L CaCl ₂ 0.54 g/L NaHCO ₃ 0.35 g/L
S'ajusta a pH 7 amb NaOH, es filtra per esterilitzar-la i s'emmagatzema a 4°C.	S'ajusta a pH 7.3 amb NaOH, es filtra per esterilitzar-la i s'emmagatzema a 4°C.

- Per a facilitar la canulació es realitza una petita incisió a la vena porta amb unes tisores petites, de punta fina i recta. Ràpidament, es canula la vena porta amb una cànula tipus *Londwel* de tefló de (Abbocath-T-16G x 51 mm-Abbott) i es tanca fent un doble nus amb força. Per a una perfusió òptima de tots els lòbuls hepàtics és important no introduir la cànula massa a prop del fetge. Si l'extrem de la cànula està massa proper al fetge, només alguns lòbuls es perfondran correctament.
- Si la canulació ha estat correcta, el fetge es comença a inflar. Immediatament (si el fetge s'infla massa o durant massa estona, provocarem dany i la viabilitat dels hepatòcits no serà adequada), es talla la vena cava inferior (just per sota dels ronyons), per a permetre la sortida del flux.
- A continuació s'obre la caixa toràcica i es canula la vena cava superior a través d'una incisió feta a l'aurícula dreta (aquesta cànula és del mateix tipus i mida que la utilitzada anteriorment per la vena porta) i es fixa la cànula mitjançant fil de sutura.
- Finalment es lliga la vena cava inferior amb el fil de sutura. D'aquesta manera s'aconsegueix tenir un circuit tancat: el medi entra per la vena porta i surt per la vena cava superior.
- Es fa circular el medi de pre-perfusió fins que el fetge estigui net de sang i el medi que surti per la via de sortida sigui transparent. Veurem que tot el fetge perd el seu color vermellós i agafa un to més groguenc.

4. És el moment de fer el canvi de la solució de pre-perfusió a la solució de perfusió a la qual s'haurà addicionat *Liberase Blendzyme* (Roche) just abans de la perfusió. *Liberase Blendzyme* és una barreja de col·lagenasa i proteases neutrals que aporten una digestió suau i homogènia per a la dissociació dels teixits. Normalment es dissolen 35 mg de *Liberase Blendzyme* (0.23U/mg) en 100 ml de solució de perfusió (aproximadament 0.08U/ml). El temps de perfusió sol ser al voltant dels 12-15 min, però pot variar segons l'activitat de la barreja *Liberase Blendzyme* i haurem d'aplicar el nostre criteri. En general, s'atura la perfusió quan es veu que el fetge té un aspecte distès i groguenc, i les puntes dels lòbuls agafen forma arrodonida. Un altre indicador de bona disgregació és quan, en tocar el lòbul hepàtic amb unes pinces, queda una marca i el teixit apartat triga en recuperar la posició original.
5. S'extreu el fetge curosament, es posa sobre d'una placa de petri sobre gel i s'extreu la càpsula de Wilson. Es disposa el fetge sobre una doble gasa col·locada sobre un embut i es dispersa tirant-hi, amb una pipeta, uns 35-50 ml de MEM-Eagle sense Ca⁺⁺ (Biological Industries) pre-refredat en gel. Es recull l'eluit en un tub de plàstic estèril tipus *Falcon* de 50 ml submergit en gel.
6. Es centrifuga a 50 g durant 3 minuts a 4°C i es descarta el sobrenedant. Es resuspèn en 35 ml de MEM sense Ca⁺⁺ i es repeteix el procés tres vegades.
7. Després de l'últim rentat, es resuspèn el sediment d'hepatòcits en 20 ml de MEM-Eagle amb Ca⁺⁺ (Biological Industries) suplementat amb un 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*).
8. Finalment, cal comprovar la viabilitat mitjançant la tinció amb blau de tripà: es fa una dilució 1:1 entre l'estoc de blau de tripà 0.4% en NaCl i els hepatòcits, i s'observa immediatament al microscopi. Habitualment, la viabilitat obtinguda seguint aquest protocol oscil·la el 90%.
9. Es realitza el comptatge d'hepatòcits en suspensió en una cambra de *Neubauer*, per poder-los sembrar a una placa de cultiu a una confluència determinada. (100.000-150.000 cell/cm²).

Cultiu primari d'hepatòcits de rata

Els hepatòcits es cultiven en plaques de cultiu de poliestirè TPP (Trasadingen, Suïssa) revestides amb col·lagen (5 µg / cm²), per tal que tinguin una matriu on adherir-se.

Preparació de plats col·lagenats:

Es preparen en una cabina de flux laminar per tal de preservar l'esterilitat.

- Es parteix d'una solució concentrada comercial de col·lagen de cua de rata 100 mg / 27 ml (Upstate) . Es dilueix amb àcid acètic 0.02 N filtrat (dilució 1/10 o 1/20 en funció del tipus de plats que usarem). Posem la quantitat de solució de col·lagen necessària a cada plat per tal d'obtenir 5 µg de col·lagen / cm² de plat, tal i com s'indica a la taula següent:

Tipus de plat	Superfície	Col·lagen	Volum solució de col·lagen (dil 1/10)	Volum solució de col·lagen (dil 1/20)
10 cm de diàmetre	55 cm ²	275 µg	743 µl	
6 cm de diàmetre	28.3 cm ²	141.5 µg	382 µl	
3 cm de diàmetre	7.1 cm ²	35.5 µg	96 µl	
de 6 pous	9.6 cm ² (per pou)	48 µg	130 µl (per pou)	
de 12 pous	3.46 cm ² (per pou)	17.3 µg		96 µl (per pou)
de 24 pous	2.4 cm ² (per pou)	12 µg		60 µl (per pou)

- Perquè tota la superfície del pou quedi ben col·lagenada ens ajudarem d'un rasclat de goma estèril (*Scraper*) i/o en el cas de plaques multipou colpejarem la placa lateralment.
- Un cop estigui tota la superfície de la placa empapada de la solució col·lagen-acètic deixarem assecar les plaques a la cabina de flux laminar fins que s'evapori i s'assequi el col·lagen en la superfície del pou. El més aconsellable és realitzar el procediment a última hora de la tarda i deixar les plaques tota la nit a la cabina, però sense llum UV, perquè degrada el col·lagen.
- Un cop seques, s'emboliquen les plaques revestides amb col·lagen amb paper d'alumini i es conserven a temperatura ambient.

Preparació de plats gelatinats:

S'han emprat plats de 24 pous als quals s'ha introduït un cubreobjectes de vidre (0.17 mm de gruix, i 10-13 mm de diàmetre) estèrils (autoclavats). Serveixen per realitzar estudis d'immunocitoquímica. Es preparen en una cabina de flux laminar per tal de preservar l'esterilitat.

Es parteix d'una solució estèril de gelatina al 0,1%.

- Es cobreixen els pous amb una solució de gelatina al 0,1%.
- S'introdueixen els plats a la nevera o a la cambra freda durant 2 hores per tal que la gelatina es solidifiqui.
- Es realitzen 2 rentats amb aigua estèril.
- Es deixen assecar a la cabina de flux laminar.
- Un cop secs, s'emboliquen amb paper d'alumini i es conserven a la nevera.

Sembrat i transfecció d'hepatòcits

- Els hepatòcits aïllats es van sembrar a una confluència de 100.000-150.000 cell/cm² en medi MEM-EAGLE amb Ca⁺⁺ suplementat amb 10% FBS (Fetal Bovine Serum) i 10 nM de dexametasona. El sèrum proporciona la fibronectina necessària per a l'adhesió cel·lular en placa.
- S'incuben a 37°C, a 5% CO₂ durant unes 3-4 hores, temps que triguen en adherir-se a la placa.
- Es van transfectar amb els vectors pC/GFP, pC/GK i pC/GK_{A456V} seguint el protocol de transfecció amb lipofectina lleugerament modificat. S'ha usat una relació 1:5 pel què fa a µg de DNA i µl de lipofectina. En aquest cas les barreges de transfecció s'han realitzat en medi HepatoZYME-SFM (GIBCO). Les cèl·lules han estat incubades amb la barreja de reacció durant la nit a 37°C en un incubador de 5% de CO₂.
- Es canvia el medi per medi de manteniment: MEM-EAGLE amb Ca⁺⁺ (Biological Industries), suplementat amb dexametasona 10 nM.

Addició de medis condicionats per facilitar o evitar la presència de la GK al nucli

- El matí següent, es renova el medi i s'hi afegeix el medi d'assaig: MEM-EAGLE amb Ca⁺⁺, que conté una concentració de glucosa 5 mM (Biological Industries) que ha estat suplementat tal i com s'indica a continuació.

MEM-EAGLE baix de glucosa	MEM-EAGLE alt de glucosa i amb sorbitol
100 U/ml penicil·lina 100 µg/ml estreptomina Dexametasona 10 nM	100 U/ml penicil·lina 100 µg/ml estreptomina Dexametasona 10 nM Glucosa 25 mM Sorbitol 200 µM

- Passats 30 minuts, es recullen els hepatòcits per a l'anàlisi. Els hepatòcits plantats en plats gelatinats seran fixats i processats per a immunocitoquímica; mentre que es

realitzarà una separació nuclear i citosòlica dels hepatòcits plantats en el plats col·lagenats.

MODELS ANIMALS I EXPERIMENTS *IN VIVO*

Models animals

Els animals utilitzats per a la realització de la majoria dels experiments que apareixen en el present treball han estat adquirits a Harlan Interfarma IBERICA. Un cop a l'estabulari del Campus de Bellvitge de la Universitat de Barcelona, els animals han estat estabulats seguint un cicle de 12 hores de llum-foscor a una temperatura constant de 22°C i alimentats amb una dieta estàndard murina (Harlan Global Diet 2014), amb accés lliure al menjar i l'aigua excepte que el protocol experimental requerís dejuni. Tots els protocols aplicats han estat prèviament aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona.

Concretament, s'han emprat:

- Mascles de ratolí (*Mus musculus*) soca ICR (CD1), de 4-5 setmanes d'edat.
- Mascles de ratolí (*Mus musculus*) soca Balb/c, de 5 setmanes d'edat.
- Mascles de rata (*Ratus norvegicus*) soca Sprague-Dawley de 150-250 mg de pes.

Model de diabetis de tipus 1: inducció de diabetis experimental mitjançant estreptozotocina

L'estreptozotocina (STZ) és una molècula constituïda per N-metil-N-nitrosurea unida al C-2 de la D-glucosa. És un tòxic que actua i destrueix la cèl·lula beta pancreàtica productora d'insulina. Per a la inducció de la diabetis experimental, ratolins de la soca ICR (CD1) d'entre 20 i 25 g de pes van ser administrats amb una única injecció intraperitoneal de STZ a una dosi de 200 mg/Kg de pes corporal, alimentats *ad libitum*. La STZ es dissol immediatament abans de la seva administració en una solució de tampó cítric: citrat sòdic 100 mM pH 4.5, ja que la STZ és extremadament làbil (es degrada en 15-20 minuts un cop resuspensa en el tampó). Un cop realitzada la injecció de STZ, els animals es deixen en les condicions de manteniment estàndard. Una setmana després, es verifica la inducció de la diabetis mesurant la glicèmia després de 8 hores de dejuni (començant entre les 8 i les 9 del matí). Només es van considerar diabètics i aptes per a l'estudi aquells ratolins que presenten glicèmies de ≥ 350 mg/dl en dejú.

En el cas de les rates, es va aplicar el mateix protocol i la mateixa dosi d'administració de STZ.

Transferència gènica hidrodinàmica

La tècnica d'injecció hidrodinàmica és un mètode físic que aconsegueix una transferència gènica preferentment al fetge amb una eficiència de fins al 40% tal i com prèviament ha estat descrit [339, 367]. La injecció hidrodinàmica s'ha realitzat, bàsicament, seguint el procediment descrit per Liu et al. [339], tal i com es detalla a continuació:

1. Per a una eficiència òptima és recomanable injectar animals d'entre 20 i 23 g de pes. Els micrograms desitjats de vector plasmídic es resuspenen en un 10% de solució salina apirògena en una xeringa de 2.5 ml. Concretament, hem utilitzat solució de Ringer-

- lactat (Grifols). És extremadament important utilitzar un DNA d'alta puresa i lliure d'endotoxines, per evitar al màxim la necrosi hepàtica deguda a LPS.
2. S'immobilitza l'animal per facilitar la injecció. No cal anestèsia. Per a dilatar les venes i facilitar la injecció, es submergeix la cua del ratolí en aigua atemperada (40-45°C) durant uns segons.
 3. Es realitza la injecció de la totalitat de la solució salina que conté el plasmidi en una de les venes caudals laterals emprant una agulla 27G (BD Microfine™). Per obtenir una bona eficiència de transfecció del fetge, és extremadament important que la injecció de la solució salina sigui feta de forma ininterrompuda i en un període de menys de 10 segons (normalment, uns 7 segons).

Mesura de la glicèmia

La glicèmia dels ratolins es controla regularment durant l'experiment mitjançant un glucòmetre Glucocard Memory 2 (Menarini). Es realitza una petita incisió a l'extrem de la cua del ratolí per extreure una gota de sang, la qual s'aplica a la tira reactiva del glucòmetre. Aquest aparell ens permet obtenir el valor de glicèmia en pocs segons.

Dejuni

En els protocols experimentals que requereixen dejuni, es retirà el pinso de les gàbies al voltant de les 9 del matí, ja que just ha acabat el període de foscor durant el qual els animals han estat menjant lliurement. En els ratolins amb diabetis experimental induïda per STZ, es va aplicar un dejuni curt, màxim de 8 hores, per evitar hipoglicèmies ja que, degut a la manca d'insulina, aquests animals no tenen reservoris de glicogen.

Test de tolerància intraperitoneal a la glucosa

Aquest test té la finalitat de comprovar si els animals són capaços de metabolitzar una sobrecàrrega de glucosa. Un animal sa és capaç de tornar als nivells basals de glucosa circulants en dues hores. En canvi, un animal diabètic encara presenta nivells elevats de glicèmia passades les dues hores. Es segueix el procés detallat a continuació:

1. En el moment del test, els animals han d'estar en dejuni (16-18h) per evitar interferències degudes a glicogenòlisi.
2. Es realitza una lectura prèvia dels nivells de glucosa circulants (temps 0).
3. S'injecta intraperitonealment 1.5 g/Kg de glucosa dissolta en salí fisiològic.
4. A partir d'aquest moment es fan extraccions de sang seriades amb un interval de 30 minuts durant 2 hores. En cada punt, s'extreu una gota de sang de la vena de la cua i se'n mesura la concentració de glucosa (temps 30, 60, 90, 120).

Gàbies metabòliques

Per analitzar les funcions fisiològiques bàsiques (ingesta, orina, defecació), els ratolins Balb/c van ser estabulats individualment en gàbies metabòliques amb lliure accés a la beguda i el menjar, durant un període de 24 hores, 18 dies després de la injecció hidrodinàmica. Es quantifica el menjar i l'aigua consumits, i també la femta i orina produïdes. També es realitza un control del pes a l'inici i al final de l'estada en gàbies metabòliques. Passat aquest període els ratolins van ésser retornats a les seves gàbies.

Experiment de radioactivitat

En el cas del model de ratolins amb diabetis tipus 1 induïda per estreptozotocina, es va veure necessari avaluar els nivells de captació de glucosa en diferents teixits dels animals transfectats amb pGK i pGK_{A456V}. L'estudi es va realitzar 48 hores post-injecció i després de 5 hores de dejuni. Per tal d'afectar el mínim possible els nivells de glicèmia dels animals, es va introduir via intraperitoneal una solució de glucosa amb glucosa marcada radioactivament (U-¹⁴C-glucosa, Amersham) a una dosi per ratolí de 0.2 mg glucosa i 10 µCi de U-¹⁴C-glucosa. Passats 30 minuts, es van sacrificar els animals per dislocació cervical i es van extreure mostres de sang, fetge, múscul i cervell (el teixit adipós no va poder ésser mesurat, perquè està molt reduït en aquest model de diabetis). Es va escollir un temps tan curt per evitar la metabolització de la glucosa marcada. (Per aquest tipus d'assaig normalment es fa servir 2-deoxiglucosa marcada, la qual no pot ésser metabolitzada). El protocol de manipulació de mostres es detalla a continuació:

Obtenció de mostres

Un cop sacrificat l'animal, en primer lloc s'extreu la sang via punció a la vena cava. Es pesa la quantitat de sang obtinguda (s'anota el pes) i es recull en vials de centelleig que contenen una solució comercial preservadora de la radioactivitat anomenada Solvable (Perkin Elmer).

A continuació s'extreu un tros de fetge, de múscul (Soleus) i de cervell. Els teixits es renten una mica amb solució salina, s'assequen lleugerament, es pesen (s'anota el pes) i es recullen en vials de centelleig que contenen 1 ml de Solvable. S'aconsella que les peces de teixit recollides tinguin d'aquest ordre:

- fetge: 50-100 mg
- teixit adipós: 50-150 mg
- múscul: 50-200 mg
- cervell: 50-150 mg

Tractament de les mostres

S'escalfen tots els vials a 50-60°C en un bany (NOTA: és important que els tubs tinguin el tap foradat per tal que no explotin al bany). El temps depèn del tipus de teixit. S'aconsella:

- múscul: 2 - 3½ hores
- fetge, cervell, teixit adipós: 1 - 2 hores
- sang: 1h

A continuació es clarifiquen les mostres que tinguin coloració per tal d'evitar interferències en la mesura. La clarificació es realitza al mateix vial de centelleig i se segueix el protocol indicat a la taula següent, segons el tipus de mostra:

	SANG	muscul / TAB	fetge / brain
Color (after solubilization)	marró / verd	Clar	Groguec
EDTA-Na₂ 0,1M	0,05 ml	-	-
H₂O₂ 30%	0,05 ml i agitar 0,05 ml i agitar 0,05 ml i agitar	- - -	0,1 ml i agitar 0,1 ml i agitar -
Incubació a temperatura ambient	15 - 30 min	-	15 - 30 min
Incubació a 50-60 ° C	1 h	-	30 min
refredar	atemperar	atemperar	atemperar

Comptatge de cpm al comptador de centelleig

S'afegeixen 10 ml de líquid de centelleig (Ecoscint H) a cada vial de centelleig i es deixa incubant durant 1 h a temperatura ambient. A continuació s'ha realitzat el comptatge en un comptador beta Wallac 1409-001 seguint el programa per ¹⁴C. Els resultats s'han expressat

com el percentatge de senyal radioactiu en cada teixit respecte el total, corregit pel pes de l'animal.

Finalment cal realitzar la descontaminació dels residus radioactius.

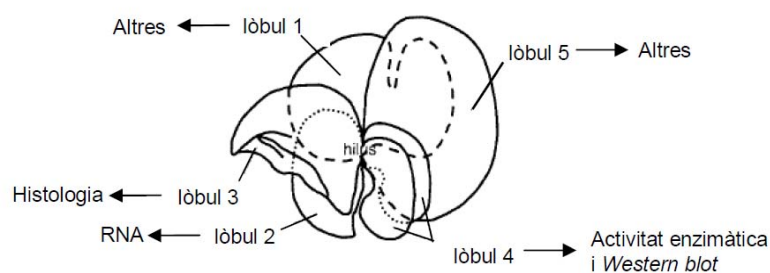
Anestèsia, eutanàsia i presa de mostres

Per a l'anestèsia, tant pels ratolins ICR (CD1) com pels Balb/c, es fa servir una combinació d'anestèsic (ketamina) i analgèsic (xilacina) administrada intraperitonealment. Les dosis administrades es recullen a la següent taula:

Principi actiu	Nom comercial	Proveïdor	Dosi
Ketamina	Imalgene 1000	Merial Laboratorio	150 mg/Kg
Xilacina	Xilagesic 2%	Laboratorios Calier	3 mg/Kg

En el punt final de l'experiment l'animal és sacrificat per intoxicació amb CO₂ o bé anestesiats amb Ketamina-Xilacina. Seguidament, es realitza una laparotomia i es procedeix a la recollida de mostres en l'ordre següent:

- 1. Obtenció de sèrum de ratolí:** es recull amb una xeringa via punció cardíaca o bé a través de la vena cava inferior. (Important: per minimitzar l'hemòlisi hem d'evitar fer massa pressió en l'extracció i, per altra banda, cal treure l'agulla abans d'abocar la sang al tub de recollida). El sèrum s'obté després de deixar coagular la sang durant 60 min a temperatura ambient. El coàgul es separa mitjançant centrifugació a 2.500 rpm a 4°C durant 15 minuts. El sèrum es manté congelat a -80°C fins el moment de la determinació dels diferents paràmetres.
- 2. Obtenció de teixits:** els teixits recollits en la necròpsia són el fetge, teixit adipós, múscul (Soleus i Gastrocnemius) i cervell (en algun cas). Un cop extrets, els teixits eren congelats ràpidament en N₂ líquid i conservats a -80°C fins el moment de l'anàlisi. En el cas del fetge, com que la transfecció hidrodinàmica pot afectar de manera diferent els lòbuls hepàtics, a l'hora de realitzar un assaig és aconsellable intentar usar peces procedents d'un mateix lòbul per a tots els animals. Es pot sistematitzar, a mode d'exemple, tal i com s'indica en la següent figura:



ANÀLISI DE PROTEÏNES

1. Preparació d'homogenats

Per mesurar activitat enzimàtica de proteïnes és necessari obtenir **homogenats en condicions no desnaturalitzants**, en què els tampons utilitzats preserven la integritat dels enzims i mantenen unes condicions similars a les fisiològiques. S'usarà el tampó que més s'ajusti a preservar l'activitat de l'enzim que volem determinar.

Amb l'objectiu de detectar el contingut proteic, inclosa la detecció de fosforilacions, s'han obtingut **homogenats en condicions desnaturalitzants** usant un tampó RIPA que conté inhibidors de fosfatases i s'ha suplementat amb inhibidors de proteases a una concentració final 1X, seguint el mateix protocol que per als extractes no desnaturalitzants.

RIPA	Inhibidors de proteases (100X)	Altres inhibidors (100X)
50 mM Tris-HCl pH 7.4	100 µg/ml Pepstatina	100 mM PMSF
1 % tritó X100	100 µg/ml Aprotinina	
1 mM Na ₃ VO ₄	100 µg/ml Leupeptina	
50 mM NaF	100 µg/ml Benzamidina	
5 mM EDTA		
40 mM β-glicerofosfat		
100 mM NaCl		

1.1 Homogenats totals de cultius cel·lulars

- Es disposen les plaques en gel, s'aspira el medi i es realitzen dos rentats amb PBS 1X pre-refredat
- S'afegeix el volum desitjat de tampó d'homogeneïtzació (uns 500 µl per a una placa de 10 cm de diàmetre)
- Es lisen les cèl·lules mitjançant tres cicles de congelació-descongelació
- Es centrifuga a 10.000 g durant 20 minuts i a 4°C
- Es recupera el sobrenedant (fracció soluble)

1.2 Homogenats totals de teixits

- Els teixits (fetges, músculs o teixit adipós) obtinguts de la necròpsia es mantenen a -80°C. S'agafen porcions del teixit i es mantenen submergides en N_{2(l)} fins al moment de l'homogeneïtzació.
- Es pesen els teixits (evitant que es descongelin) i s'anoten els mg que fa cada peça. Habitualment s'agafen peces d'entre 50 i 100 mg.
- S'homogenitzen en 9 volums de tampó d'homogeneïtzació pre-refredat. La composició del tampó d'homogeneïtzació variarà segons l'assaig que es vulgui realitzar. És molt important mantenir les mostres en fred en tot moment, submergint el tub en gel per a preservar l'activitat enzimàtica. Depenent de la consistència del teixit s'han aplicat diferents metodologies per a l'homogeneïtzació:

- Per teixits tous (teixit adipós i fetge) s'ha usat un *Potter* (Bayer), aplicant 10 polsos a 1.500 rpm.
- Per teixits fibrosos (múscul) s'ha usat el *Polytron PT3000* (Kinematica) el qual és més agressiu. Es mantenen 3 polsos de 10.000 rpm durant 10 segons aproximadament.
- Es centrifuga a 20.000 g durant 15 minuts a 4°C

2. Quantificació de la concentració de proteïna dels homogenats

Els mètodes més utilitzats actualment per mesurar la concentració de proteïna es basen en l'absorció en l'UV o bé en l'espectrometria en el visible després de la reacció de la proteïna amb un reactiu per generar un cromòfor. De manera generalitzada, quan el tampó conté SDS, el mètode d'elecció és el BCA, mentre que si conté agents reductors resulta més convenient el mètode Bradford.

Convé obtenir una recta patró a partir d'una proteïna de concentracions conegudes, típicament albúmina sèrica bovina (BSA). Es representen els valors d'absorbància respecte la concentració i s'obté una regressió lineal. A partir del valor d'absorbància obtingut per la mostra que es vol analitzar, es pot calcular la concentració mitjançant la recta patró obtinguda. Si l'absorbància de la proteïna problema cau fora del rang de la patró, l'error podria ser bastant gran i per tant caldria afegir més mostra o bé diluir-la i repetir la quantificació (orientativament, pels homogenats de fetge cal fer una dilució 1/8 o 1/10; pels homogenats de múscul i de teixit adipós, una dilució 1/3).

2.1 Mètode Bradford

S'ha utilitzat el *Bio-Rad protein assay* (Bio-Rad), que permet quantificar proteïnes segons el mètode de Bradford (1976). Es tracta d'un mètode colorimètric que es basa en el canvi de color d'una solució àcida de blau brillant de Comassie (G-250), que, en unir-se a proteïnes, canvia el seu màxim d'absorbància de 465 nm a 595 nm. És un mètode fàcil i ràpid, que requereix un reactiu únic i té poques interferències.

La recta patró es construeix amb BSA a un rang de concentracions entre 0 i 5 µg/µl, per estar dins del rang de linealitat del mètode. Es pot guardar a -20°C i reutilitzar-se.

Mètode:

El reactiu Bradford s'utilitza diluït 1:5 en aigua. S'ha usat el protocol adaptat a plaques ELISA, de 96 pouets, i s'aconsella fer triplicats de la mesura per a cada mostra i a cada punt de la patró.

1. Es posen 2 µl de patró o mostra als pouets corresponents
2. S'afegeixen 200 µl de Bradford a cada pouet
3. Es deixa la placa a temperatura ambient de 5 a 10 minuts i es realitza la lectura de l'absorbància a 595 nm (també es pot realitzar la determinació amb el filtre de 620 nm, en el cas que no tinguem el de 595 nm). El complex proteïna-colorant té una estabilitat òptima entre 15 i 60 minuts.

2.2 Mètode BCA

El reactiu BCA (Pierce) permet la detecció i quantificació colorimètrica de proteïna total. Aquest mètode es basa en la reacció de biuret, en la qual el Cu^{+2} es redueix a Cu^{+1} en presència de proteïna (l'estructura macromolecular proteica, les unions peptídiques i la presència dels aminoàcids cisteïna, cistina, triptòfan i tirosina). El Cu^{+1} és quelat per 2 molècules d'acid bicinchoninic (BCA) el qual adquireix color porpra i pot ésser detectat a 540 nm. L'avantatge del BCA és que permet una detecció altament sensible i selectiva de proteïna, i, a més a més, aquest sistema és compatible amb la presència de detergents a les mostres a analitzar.

La recta patró es construeix amb BSA a un rang de concentracions entre 0 i 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, per estar dins del rang de linealitat del mètode. Es pot guardar a -20°C i reutilitzar-se.

Mètode

S'ha usat el reactiu BCA (Pierce) el qual es prepara al moment barrejant les solucions A i B a una proporció 1:50. S'ha usat el protocol adaptat a plaques ELISA, de 96 pouets, i s'aconsella fer triplicats de la mesura per a cada mostra i a cada punt de la patró.

1. Es posen 3 μl de mostra o patró als pouets corresponents
2. S'afegeixen 200 μl de BCA
3. S'incuba a 37°C durant 30 minuts i es realitza la lectura de l'absorbància a 550 nm.

3. Separació i detecció de proteïnes per Western Blot

3.1 Preparació de les mostres

A partir de la quantificació del contingut de proteïna dels extractes proteics, es preparen les mostres igualant-ne la quantitat de proteïna (normalment 30 μg) i el volum final. A continuació es tracta en condicions reductores i desnaturalitzants amb el tampó de càrrega a una concentració final 1X i s'escalfa a 95°C durant 5 minuts.

Tampó de càrrega 4X
Tris-HCl 200 mM pH: 6.8
40% glicerol
8% SDS
20% β -mercaptoetanol
0.8% Blau de bromofenol

Aquest tractament de la mostra amb el detergent aniònic dodecilsulfat (SDS) en presència de β -mercaptoetanol i d'escalfor desnaturalitza les proteïnes, proporcionant-los-hi a més una càrrega neta negativa que permet el seu desplaçament cap el pol positiu en un camp elèctric.

La preparació de mostres es pot fer dies abans de l'electroforesi. En aquest cas, és recomanable guardar-les a -20°C .

3.2 Western blot

Es separen les proteïnes en funció del seu pes molecular mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE).

S'ha utilitzat el kit *Mini Protean III* (Bio-Rad).

3.2.1 Preparació dels gels

Per realitzar l'electroforesi s'utilitzen dos tipus de gels: un de concentració o apilament (stacking) i un de separació (running). El gel d'apilament té un menor percentatge d'acrilamida la qual cosa dóna una mida de porus més gran que permet concentrar les proteïnes en una línia abans d'ésser separades. En canvi, el gel de separació té un percentatge d'acrilamida més gran generant així una malla amb porus més petit que permet la separació de les proteïnes per pes molecular. El percentatge d'acrilamida del gel separador dependrà de la mida de les proteïnes que es volen analitzar.

Preparació del gel

Es netegen els vidres amb etanol i es fa el muntatge tal com descriu el fabricant. A continuació es barregen els següents components en un recipient (per exemple, un falcon):

(dades per a 2 gels petits)

GEL SEPARADOR	8 %	10 %	12.5 %
Tampó lower	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml
Solució acrilamida 40%	2.98 ml	3.75 ml	4.65 ml
Aigua	8.27 ml	7.5 ml	6.6 ml
TEMED	25 µl	25 µl	25 µl
APS 10%	75 µl	75 µl	75 µl

RECEPTA TAMPÓ LOWER: Tris- HCl 1.5 M pH 8.8, 0.4% SDS

El TEMED és el donador de radicals i inicia la reacció de polimerització; mentre que l'APS, amonium persulfat, és el continuador de la polimerització. S'afegeixen a la solució just abans de posar el gel al muntatge. Després d'afegir aquests dos catalitzadors de la polimerització, cal agitar bé el contingut del vial i, amb l'ajut d'una pipeta Pasteur, afegir la solució entre els vidres. El gel que quedi dins el vial serveix per controlar la velocitat de polimerització.

A continuació s'afegeixen suaument dues o tres gotes d'aigua o d'isopropanol sobre el gel, per tal de fer desaparèixer qualsevol bombolla de la superfície i per a què la superfície del gel quedi plana i recta.

Un cop s'ha polimeritzat, es llença l'aigua o l'isopropanol i s'asseca l'excés amb paper de cel·lulosa deixant l'espai entre els vidres ben sec.

A continuació es procedeix a la preparació del gel concentrador (stacking)

GEL CONCENTRADOR	3%
Tampó upper	2 ml
Acrlamida 40%	0.60 ml
Aigua	5.40 ml
TEMED	10 µl
APS 10%	40 µl

RECEPTA TAMPÓ UPPER: Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 0.4% SDS

Després d'afegir els catalitzadors de la polimerització cal agitar bé el vial i abocar el contingut entre els vidres del muntatge, fins a dalt de tot.

En aquest moment es col·loca la pinta sobre el gel i cal esperar que polimeritzi el gel.

NOTA: els gels poden preparar-se el dia abans i guardar-se a 4°C embolcallats de paper de filtre humitejat i paper de plata (per tal de tenir un ambient humit i no s'assequin).

3.2.2 Electroforesi

Es treuen les pintes dels gels i es munten en el suport d'electroforesi del kit de BIO-RAD. Entre els 2 gels es forma una cambra que serà la superior durant l'electroforesi (contacte amb el

càtode). A continuació s'omple aquesta cambra superior amb tampó d'electroforesi. També cal omplir la cambra inferior (ànode) amb tampó d'electroforesi fins 1 cm per sota de la part superior dels vidres grans; d'aquesta manera aconseguim que les dues cambres contactin entre elles a través dels gels.

Tampó d'electroforesi 10X
Tris 250 mM (30.3 g/L)
Glicina 1920 mM (144 g/L)
SDS 20% 50 ml
pH 8.3 (s'ajusta abans d'afegir l'SDS)

És el moment de carregar les mostres als pouets corresponents del gel. Es reserva un pouet per carregar el marcador de pes molecular (Rainbow; Amersham).

A continuació s'aplica el camp elèctric per separar les proteïnes. L'electroforesi té lloc a un voltatge constant 100-130 V durant aproximadament 90-120 minuts o fins que el front de Blau de Bromofenol surti del gel. És important que l'amperatge no superi els 100 mA.

3.2.3 Electrotransferència

Després de l'electroforesi es descarta el gel concentrador (stacking) i la resta del gel es submergeix en tampó de transferència. A continuació es talla una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore) de la mateixa mida del gel. S'ha d'activar en metanol durant 30 segons, hidratar-la després en aigua bidestil·lada durant dos minuts i finalment es deixa la membrana en una safata amb tampó de transferència. A més, per cada gel a transferir, es posen a les safates a remullar en tampó de transferència 2 espongetes i 4 trossos de paper Whatmann 3 MM lleugerament més grans que el gel.

Es procedeix al muntatge del sistema de transferència. Es fa sobre la part negra del sistema i en el següent ordre:

- esponja
- 2 trossos de paper Whatmann 3 MM
- Gel
- Membrana (es pot marcar amb un tall en un extrem per controlar la seva orientació després de l'electrotransferència)
- 2 trossos de paper Whatmann 3 MM
- Esponja

És molt important que no quedin bombolles entre el gel i la membrana perquè això impediria la transferència de les proteïnes.

La transferència es duu a terme de forma general a 400 mA durant 90 minuts, o durant la nit a 15 V (14-16 hores) en tampó de transferència 1X amb un 10% de metanol. Cal mantenir agitació contínua i també cal algun sistema de refrigeració (glaçó o cambra freda) per evitar escalfament de les membranes que puguin malmetre les proteïnes.

Tampó de transferència 10X
Tris 250 mM (30.3 g/L)
Glicina 1920 mM (144 g/L)
pH 8.3
Per preparar 1L de tampó 1X: 800 ml d'aigua bidestil·lada 100 ml de tampó de transferència 10X 100 ml de metanol.

3.2.4. Immunodetecció

Després de la transferència, s'incuba la membrana en una solució de TBS-T 1X amb 5% de llet desnatada durant 1 hora a temperatura ambient. La finalitat d'aquesta incubació amb una solució rica en proteïnes és evitar la unió inespecífica de l'anticòs. El percentatge de Tween 20 del tampó TBS-T depèn de l'afinitat i/o especificitat de l'anticòs a utilitzar (0.05% : el menys astringent; 0.5% : el més astringent).

S'incuben les membranes amb la dilució adequada d'anticòs primari suspès en una solució de TBS-T amb 5% de llet o bé de BSA i amb 0.02 % d'azida sòdica, la qual evita la putrefacció de la solució proteica. La incubació pot tenir lloc durant 2 hores a temperatura ambient o bé durant la nit (o durant el cap de setmana) a 4°C. La solució d'anticòs primari es recicla mentre sigui funcional.

Es renten les membranes amb un volum petit (20 ml aproximadament) de TBS-T 1X. Es fa un rentat ràpid i tres de 10 minuts en agitació.

TBS 20X
Tris- HCl 200 mM
NaCl 3M
pH 7.4

Incubar les membranes amb l'anticòs secundari diluït en TBS-T (1/2000 - 1/50000) durant una hora a temperatura ambient. Aquest anticòs detecta IgG de l'espècie en què s'ha generat l'anticòs primari i té conjugada peroxidasa de rave (HRP).

Es renten les membranes amb un volum petit de TBS-T 1X. Es fa un rentat ràpid i tres de 10 minuts en agitació. Es fa un rentat final de TBS durant 10 minuts.

3.2.5. Revelat

L'anticòs secundari està conjugat a l'enzim peroxidasa de rave (HRP), que permet visualitzar les bandes corresponents a les proteïnes que el primari reconeix gràcies a la generació d'un producte quimioluminiscent quan s'incuba durant 1 minut amb una barreja 1:1 dels reactius de *ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences*. El revelat es duu a terme posant en contacte les membranes amb pel·lícules fotogràfiques (CurixRP2, Agfa) durant un temps variable i utilitzant els líquids tradicionals de revelat i fixat. Alternativament, es realitza revelat digital en un equip d'imatge *Fujifilm LAS 3000 Intelligent Dark Box IV*.

Anàlisi densitomètric

L'estimació quantitativa de les proteïnes es realitza per densitometria dels films mitjançant el programa *Quantity One*, quan el revelat s'ha dut a terme en pel·lícules fotogràfiques, o a través del programa *Multi Gauge*, en el cas de revelat digital. Els resultats són sempre expressats com a unitats arbitràries (relació entre la intensitat ajustada de la banda de la proteïna en estudi i de la proteïna normalitzadora).

	Dilució	Origen	Mida (Kda)	Proveïdor
ACC	1/2000	C	257 (α)/280 (β)	Upstate
ACC-P Ser-79	1/2000	C	257	Upstate
β -actina	1/1000	R	42	Sigma
AKT	1/400	Ca	60	Sta. Cruz
AKT-P Thr 308	1/1000	C	60	Cell Signalling
AMPK α	1/1000	C	62	Cell Signalling
AMPK-P Thr 172	1/1000	C	62	Cell Signalling
Chrebp	1/1000	C	95	Novus Biologicals
eIF-2 α	1/1000	C	40	Cell Signalling
GK (H-88)	1/500	C	52	Sta. Cruz
Histona-H2A	1/500	C	14	Dr. Chiva
L-PFK2	1/500		69	Sta. Cruz
Ub-PFK2	1/100	C	69	Dr. Bartrons
L-PK	1/1000	C	60	Dr. Bartrons
PEPCK-C	1/20000	O	69	Dr. Granner
PPAR- γ	1/1000	C	53-57	Sta. Cruz
S6K-P	1/1000	R	70	Cell Signalling
SOD-1	1/1000	R	37	Novacastra
SOD-2	1/1000	C	20	Novus Biologicals
γ -tubulina	1/10000	R	48	Sigma
α -tubulina	1/4000	R	50	Sigma
VDAC	1/1000	R	32	Cell Signalling

Taula: Anticossos primaris utilitzats. C = conill; Ca = cabra, O = ovella; R = ratolí.

3.2.6 Reutilització de membranes

Les membranes poden guardar-se assecades entre dos papers de filtre, o en bossetes amb Silicagel.

Quan es volen reutilitzar per detectar proteïnes que no tenen el mateix pes molecular que les que s'hi han detectat:

1. Submergir la membrana en metanol durant uns 20 segons
2. Rentar-la amb aigua fins que la membrana s'hidrati (s'enfonsi)
3. Rentar amb TBS-Tween en agitació durant 5 minuts.
4. Procedir al bloqueig i després a la immunodetecció.

Quan es volen reutilitzar per detectar proteïnes que tenen un pes similar a les que s'hi han detectat i a més tenen el mateix anticòs secundari:

1. (Si partim d'una membrana seca cal activar-la amb metanol i seguidament hidratar-la amb aigua. En cas que la membrana estigui humida procedim directament a la incubació amb solució de Stripping). Submergir la membrana en la solució de Stripping, en un bany a 55°C en agitació durant 30 minuts.

Solució de Stripping
Tris-HCl 62.5 mM (3 ml de Tris 1M per a 50 ml)
SDS 2% (5ml de SDS 20% per 50 ml)
pH: 7.4
β - mercaptoetanol 160 mM (560 μ l de β -mercaptoetanol 14.3 M) Afegir al moment.

2. Rentar amb TBS-Tween 1X, fins que no s'olori el β -mercaptoetanol.
3. Procedir al bloqueig i després a la immunodetecció.

TÈCNIQUES IMMUNOLÒGIQUES

1. Immunocitoquímica d'hepatòcits en cultiu

El material de partida són cèl·lules que han crescut sobre cobreobjectes de vidre (0.17 mm de gruix i 10-13 mm de diàmetre) situats en plats de cultiu de 24 pouets. En aquest treball s'han emprat hepatòcits en cultiu primari els quals han estat plantats sobre cobreobjectes gelatinats (per tal que els hepatòcits disposessin d'una matriu de suport per al seu creixement).

Protocol

- Aspirar el medi de cultiu i rentar amb PBS.
- Afegir 300 µl de solució de fixació a cada pouet, durant 20 minuts a temperatura ambient. La **fixació** serveix per mantenir l'estructura cel·lular i la integritat dels antígens. Tot i que existeixen diferents tipus de fixadors (aldehids, alcohols), s'ha emprat una solució de fixació amb **paraformaldehid al 3%**. *NOTA: En cas de no poder prosseguir amb la immunocitoquímica, després de la fixació es pot aspirar la solució de fixació, rentar amb PBS i afegir PBS amb azida sòdica al 0.2%, tapar la placa amb parafilm, i guardar-la durant uns dies a la nevera.*

Solució de Fixació
Paraformaldehid 3%
Sacarosa 60 mM
Tampó PB 0.2 M pH 7.4 (obtingut amb la mescla de Na ₂ HPO ₄ 0.2M, NaH ₂ PO ₄ 0.2M)

Solució stock de paraformaldehid
Es prepara una solució al 16 %, 20 % o 40% (pes/volum) en aigua bidestil·lada. Per tal que es dissolgui s'ha de mantenir en contínua agitació a una temperatura entre 65-75°C, afegir unes gotes de NaOH 6N fins que es dissolgui i enrasar al volum final desitjat. Després s'aliquota i es guarda congelat a -20°C. D'aquesta manera el descongelarem i prepararem el tampó a utilitzar just en el moment necessari, assegurant que sempre estigui en bones condicions.
Durant la preparació del paraformaldehid es desprenen vapors tòxics, per tant, cal treballar sota campana d'extracció.

- Fer 2 rentats amb tampó PBS que contingui glicina 20 mM (quan s'han emprat fixadors aldehics, és aconsellable mantenir la glicina en tots els tampons de rentat, bloqueig, etc, per bloquejar tots els grups aldehids que hagin quedat lliures).
- Afegir 300 µl de solució de **permeabilització** (PBS-glicina 20 mM i tritó X-100 al 0.2 %), durant 10 minuts a temperatura ambient. La permeabilització és necessària quan es volen detectar antígens intracel·lulars. Amb aquesta finalitat s'empren detergents (saponina, tritó X-100, nonidet, etc) que actuen sobre la membrana cel·lular per permetre el pas d'anticossos. El detergent, la concentració i el temps s'han de decidir en funció de l'antígen a detectar i del tipus cel·lular.
- Fer 2 rentats amb tampó PBS-glicina 20 mM.

- Afegir 300 µl de solució de solució de **bloqueig** (PBS-glicina 20 mM, 0.1% titó X-100 i BSA 1%) durant 20 minuts a temperatura ambient. El bloqueig amb BSA (*Bovine Serum Albumine*) és necessari en tots els casos per evitar unions inespecífiques dels anticossos. En lloc de BSA es pot emprar ovoalbúmina o gelatina.
- Afegir 150 µl de la solució amb anticòs primari (PBS-glicina 20 mM, 0.1% tritó X-100, BSA 1% i anticòs primari) a cada pou i deixar incubar-ho durant tota la nit a 4°C. En el cas de la GK, vam usar l'anticòs anti-GK d'Abgen a una dilució 1/50.
- Fer 2 rentats de 5 minuts amb PBS-glicina 20 mM. Després de l'últim rentat, aspirar bé (però cal anar molt alerta per evitar que s'assequin les cèl·lules).
- Afegir 25-30 µl de la solució amb anticòs secundari (PBS-glicina 20 mM, 0.1% tritó X-100, BSA 1%, TOPRO-3 1/1000 per marcar els nuclis i anticòs secundari) sobre cada cobreobjecte i deixar-ho incubar durant 1 hora a temperatura ambient. En aquest experiment vam usar un anticòs anti-conill AlexaFluor 488, a una dilució 1/400.
- Fer 2 rentats de 5 minuts en PBS.
- Muntar el cobreobjectes sobre el portaobjectes, al qual s'ha afegit una gota de Mowiol, de manera que les cèl·lules estiguin en contacte amb el Mowiol. Es deixa assecar i es pot guardar a -20°C.

2. Preparació de mostres histològiques

En aquest treball s'han aplicat dues tècniques diferents per a obtenir seccions per a realitzar les tècniques d'histologia. La primera es basa en la perfusió de l'animal sencer amb una solució fixadora i la posterior secció dels teixits en un vibràtom. La segona es basa en la fixació del teixit *ex vivo* i l'obtenció de crioseccions de 7 µm.

1.1 Obtenció de seccions de 50 µm

Per a la doble visualització de GFP i PEPCK-C en els fetges de ratolins injectats amb la transferència gènica hidrodinàmica es van obtenir seccions de 50 µm tal i com es detalla a continuació:

1. S'anestesien els ratolins amb xilacina:Ketamina
2. Es realitza la laparotomia i s'exposa el tòrax.
3. Es perfora el ratolí amb una solució de PBS 1X amb Heparina 0.05% mitjançant la punció del ventricle esquerre amb una agulla epicranial (palometa) 25G connectada a un sistema d'infusió. El flux es controla mitjançant una clau de pas. De seguida que veiem que hi ha flux, es perfora l'aurícula dreta.
4. Seguidament, es fa una segona perfusió amb uns 20 ml de PBS 1X, 4% paraformaldehid (PFA).
5. Es recullen els òrgans d'interès i per completar-ne la fixació, es deixen les peces de fetge durant tota la nit a 4°C en PBS 1X – 4% PFA.
6. Les peces fixades en PBS-4% PFA es tallen en seccions de 50 µm en un vibràtom (Leica VT 1000).
7. Les seccions es submergeixen en solució de criopreservació (34.5% glicerol, 30% etilenglicol, en PBS 1X) durant 1 hora (perquè s'impregnin bé) abans de guardar-les a -20°C.

1.2 Obtenció de seccions de 7 µm

La immunohistoquímica de GK en ratolins diabètics injectats hidrodinàmicament es va realitzar sobre crioseccions de 7 µm que van ser obtingudes tal i com es detalla a continuació.

1. En la necròpsia es pren una porció del tercer lòbul hepàtic i es submergeix en una solució del 4% PFA en PB 0.1M durant un mínim de 24 hores, per a la seva fixació completa (s'aconsella un volum de solució de fixació 50X la mida de la peça per afavorir una perfecta penetració del PFA al teixit)
2. La peça s'equilibra en una solució 30% sacarosa en PBS 1X a 4°C fins que la peça baixa al fons pel seu propi pes (indicació de que la sacarosa ha penetrat bé dins la peça; ara bé, determinats teixits com l'adipós no s'enfonsen a causa de la seva constitució). Si la incubació s'allarga massa cal afegir azida sòdica al 0.02% per evitar la putrefacció proteica.
3. S'inclou la peça en motllos *Cryomold* amb *Tissue-Tek OCTTM compound* (Sakura) i es congela per flotació sobre una placa de petri en un bany de N_{2(l)} o de neu carbònica (s'aconsella que la congelació sigui lenta per preservar les estructures del teixit). És important col·locar la peça de manera que quedi ben orientada a l'hora de tallar al criostat.
4. Els motllos es guarden a -80°C fins a l'obtenció de seccions de 7 µm en un criostat.
 - CONSELLS PER TALLAR AL CRIÒSTAT: És molt important atemperar les peces dins del criostat un mínim de 30 minuts. A continuació s'enganxa la peça al suport del criostat amb OCT líquid i s'espera fins que es solidifiqui. Desbastar i tallar la peça. A fora tindrem els portes polilisinats a temperatura ambient. Es treu el tall amb un pinzell i es posa sobre del porta i per la diferència de temperatura el tall queda adherit. Es deixa a fora perquè s'acabin d'enganxar bé.
5. Les crioseccions s'emmagatzemen a -20°C.

3. Immunohistoquímica

La immunohistoquímica de PEPCK-C s'ha realitzat en crioseccions de 50 µm. En aquest cas, les incubacions es realitzen en plaques TPP de 24 pouets en un volum final de 300 µl. En canvi, la immunohistoquímica de GK i de glucosa-6fosfatasa s'han realitzat sobre crioseccions de 7 µm i les incubacions es realitzen directament sobre el porta-objectes.

1. Es recuperen les seccions de -20°C. En el cas de les crioseccions en porta-objectes, es deixen assecar bé (una hora o més) per a que s'hi adhereixin bé. En els dos casos, es fa un rentat ràpid i dos rentats de 20 minuts en PBS 1X (per eliminar les solucions de crioperservació).
2. Bloqueig i permeabilització: s'incuba durant 2 hores en PBS 1X, Tritó X-100 0.3%, 20% FCS.
3. Incubació amb l'anticòs primari:
 - a. Per PEPCK: s'usa l'anticòs anti-PEPCK-C 1/10000 en PBS 1X, 1% Tritó X-100, 1% FCS durant 48 hores a 4°C en agitació lenta. A més, es duen en paral·lel dos controls negatius: un en el que no hi incubem l'anticòs i un altre on posem una dilució equivalent del sèrum d'ovella (animal en el que s'ha produït l'anticòs contra PEPCK).

- b. Per GK, s'usa l'anticòs GK (AP7901c-Abgen) 1/50 en PBS 1X, 1% Tritó X-100, 1% FCS. La incubació té lloc durant tota la nit a 4°C.
 - c. Per glucosa-6-fosfatasa, s'usa l'anticòs per a la subunitat catalítica de Santa Cruz (sc-27198) en dilució 1/50.
4. Quatre rentats de 10 minuts amb PBS 1X a temperatura ambient.
5. Incubació amb l'anticòs secundari a baixa agitació. Aquest punt i els propers s'han de fer protegint la mostra de la llum en tot moment per tal de preservar la fluorescència.
 - a. IgG anti-ovella conjugat a Alexa Fluor 456 (Molecular Probes) a una dilució 1/200 en PBS 1X, 1% Tritó-X100, 1% FCS durant 2 hores a 4°C.
 - b. IgG anti-conill conjugat a Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) a una dilució 1/400 en PBS 1X, 1% Tritó-X100, 1% FCS durant 2 hores a 4°C.
 - c. IgG anti-cabra conjugat a Alexa Fluor 647 (Molecular Probes) a una dilució 1/200 en PBS 1X, 1% Tritó-X100, 1% FCS durant 2 hores a 4°C.
6. Quatre rentats de 10 minuts amb PBS 1X a 4°C.
7. Muntatge: s'utilitza Mowiol com a medi de muntatge. L'òptim de fluorescència s'obté entre 12 i 24 hores després del muntatge.
8. Les preparacions es van analitzar per microscòpia confocal als Serveis Científico-Tècnics de la Unitat de Biologia del Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona. S'analitzaren diversos camps escollits de manera aleatòria a un augment de 200X.

DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES

Activitat GK

La mesura de l'activitat GK en cèl·lules en cultiu o en teixit hepàtic es va realitzar mitjançant una reacció acoblada amb la glucosa-6P-deshidrogenasa, segons han descrit prèviament Davidson i Arion [466]. Es detecta l'aparició de NADH, producte de l'activitat GK, a una longitud d'ona de 340 nm.

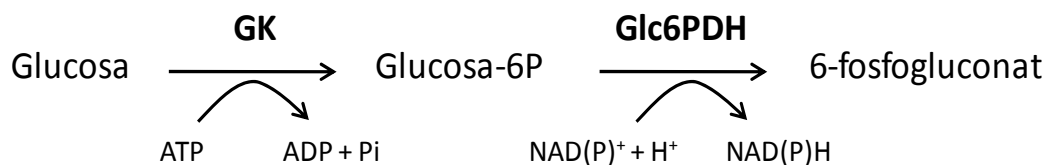


Figura 87. Esquema de les reaccions acoblades a l'assaig glucocinasa.

- Es preparen els homogenats totals de fetge en tampó d'homogeneïtzació (relació 1:9 pes:volum). Els homogenats es centrifuguen a 100.000 g durant 1 h a 4°C i se'n recupera el sobrenedant (fracció citosòlica) per a la determinació d'activitat GK. L'activitat GK s'ha de determinar en extractes frescos ja que la congelació fa perdre considerablement l'activitat GK.

Solució d'homogeneïtzació per a activitat GK
HEPES 50 mM pH 7.4
KCl 100 mM
EDTA 1 mM
MgCl ₂ 5 mM
DTT 2.5 mM *

* Aquesta solució es pot preparar amb antelació i conservar a 4 °C, però el DTT s'ha d'afegir en fresc, és a dir, al moment de l'homogeneïtzació.

- Es prepara el set de cubetes amb 40 µl de l'homogenat + 955 µl de tampó de reacció (Vf=995 µl).

Tampó de reacció	Comentaris
HEPES 50 mM	Es pot preparar una solució 10X d'aquests 3 components (HEPES 500 mM, KCl 1 M, MgCl ₂ 75 mM) i conservar-la a 4°C.
KCl 100 mM	
MgCl ₂ 7.5 mM	
NAD ⁺ 1 mM	Posem a la cubeta 50 µl d'un estoc 20 mM que hem preparat en fresc.
ATP + MgCl ₂ 5 mM	Posem a la cubeta 50 µl d'un estoc 100 mM (pot guardar-se a -20°C).
BSA 1%	Posem a la cubeta 100 µl d'un estoc BSA 100 mg/ml. Es pot prescindir del BSA quan determinem l'activitat d'extractes cel·lulars, ja que no acostumen a presentar terbolesa.
Glucosa (100mM/5mM/0.5mM, segons s'indiqui)	Posem a la cubeta 50 µl d'un estoc de glucosa 2M, 0.1M o 0.01M respectivament (poden guardar-se a -20°C).
Mostra	Cal ajustar la quantitat de mostra per tal que l'activitat sigui lineal. Orientativament posem, 20 µl d'extracte hepàtic i 50 µl d'extracte cel·lular.
Aigua	Fins arribar a 995 µl

- S'inicia la reacció enzimàtica amb l'addició de 5 U (5 µl) de Glucosa-6P-Deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (completant un volum final de 1 ml).
- Immediatament s'inicia la lectura a una longitud d'ona de 340 nm durant 10 minuts cada 10 segons en un espectrofotòmetre DU 800 Beckman Coulter. Si hi ha activitat GK detectable es perfila un pendent positiu, degut a l'aparició de NADH.
- L'activitat es calcula a partir del pendent de la recta que s'obté i tenint en compte el coeficient d'extinció molar (ϵ) del NADH (6.22 cm²/µmol) i es corregeix pel contingut proteic de l'extracte.

Activitat Glc 6P DH

L'activitat glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6PDH) es determina espectrofotomètricament a una longitud d'ona de 340 nm a 37 °C seguint mètodes descrits prèviament per Kornberg & Horecker (1955) i Pekovich (1996). Es detecta l'aparició del NADPH, producte de l'activitat Glc6PDH a concentracions saturants del substrat Glc6P.

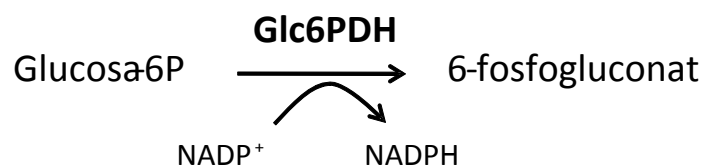


Figura 88. Esquema de la reacció catalitzada per la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.

- Es preparen els homogenats totals de fetge en tampó d'homogeneïtzació (relació 1:9 pes:volum). Els homogenats es centrifuguen a 20.000 g durant 20 min a 4°C i se'n recupera el sobrenedant per a la determinació de l'activitat Glc6PDH.

**Solució d'homogeneïtzació
per a activitat Glc6PDH**

Tris-HCl 20 mM pH 7.6
EDTA 1 mM
Triton® X-100 0.02% (v/v)
deoxicolat sòdic 0.2g/L
DTT 1 mM *
PMSF 20 mM *

* Aquesta solució es pot preparar amb antelació i conservar a 4 °C, però el DTT i el PMSF s'han d'afegir en fresc, és a dir, al moment de l'homogeneïtzació.

Alternativament també poden usar-se els extractes que han sobrat en la determinació d'activitat GK.

NOTA: L'activitat Glc6PDH es manté en els extractes durant 1 setmana conservats a -20°C o durant 1 mes a -80°C.

- Es prepara el set de cubetes amb el tampó de reacció.

Tampó de reacció	Comentaris
Tris-HCl 50 mM pH 7.6	Posem a la cubeta 500 µl d'un estoc Tris-HCl 100 mM pH 7.6
Glucosa-6P 2 mM	Posem a la cubeta 20 µl d'un estoc de Glucosa-6P 100 mM
NADP ⁺ 0.5 mM	Posem a la cubeta 10 µl d'un estoc de NADP ⁺ 50 mM
Aigua	* Fins arribar a 1 ml

* La quantitat d'aigua i de mostra pot variar segons el tipus de mostra i cal ajustar-les experimentalment per tal que l'assaig sigui lineal.

- S'introdueixen les cubetes a un espectrofotòmetre DU 800 Beckman Coulter per tal que s'atemperin a 37°C, durant uns 2 minuts.
- S'addiciona la mostra (en el nostre cas, 30 µl) i immediatament s'inicia la lectura a una longitud d'ona de 340 nm durant 10 minuts cada 10 segons en un. Si hi ha activitat Glc6PDH detectable es perfila un pendent positiu, degut a l'aparició de NADPH.
- L'activitat es calcula a partir del pendent de la recta que s'obté i tenint en compte el coeficient d'extinció molar (ϵ) del NADPH (6.22 cm²/µmol) i es corregeix pel contingut proteic de l'extracte. Els resultats s'expressen en mU/mg de proteïna, entenent 1 U com la quantitat de NADP⁺ reduïda en 1 min.

Determinació de paràmetres sèrics

Determinació de glucosa

Els nivells de glucosa sèrics es determinen a partir d'una gota de sang dels ratolins obtinguda de l'extrem de la cua. Es va fer servir el sistema Glucocard Memory 2 (Menarini).

Determinació d'insulina

La insulina en sèrum es determina per ELISA (Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA, Bender MedSystems) seguint les indicacions del fabricant. S'utilitzen 5 µl per a animals sans i 25 µl per a animals diabètics tipus I (ICR (CD1) tractats amb STZ).

Determinació de Glutamat Piruvat Transaminasa (GPT) E.C. 2.6.1.2.

La Glutamat Piruvat Transaminasa (GPT) és un enzim hepàtic que en situacions de dany hepàtic és alliberat al torrent sanguini, augmentant-ne la concentració sanguínia. La mesura d'aquest enzim és utilitzada en el diagnòstic de determinades malalties hepàtiques com l'hepatitis o cirrosi. La mesura dels nivells de GPT dels sèrums dels ratolins es va fer utilitzant les tires reactives de l'autoanalitzador Reflotron®.

Determinació d'àcids grassos no esterificats (AGL), Triglicèrids (TAG), beta-Hidroxi butirat (β -HBA), colesterol i lactat

Aquestes mesures van ser fetes al servei de Bioquímica Clínica Veterinària de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona utilitzant un autoanalitzador COBAS-MIRA.

Determinació d'IGFBP-2 en sèrum

Es va determinar la quantitat de IGFBP-2 en sèrum de ratolins mitjançant la tècnica ELISA, amb el kit de *RayBio® Mouse IGFBP-2 ELISA Kit*. Es tracta d'un assaig que emprava un anticòs específic per a la IGFBP-2 unit covalentment a una placa de 96 pous. S'hi afegeixen les mostres i la patró, i la IGFBP-2 present a la patró i a les mostres s'unirà als anticòssos immobilitzats. A continuació, els pous són rentats i s'hi afegeix un anticòs anti IGFBP-2 biotinitat. Després es renten els pous per eliminar l'excés d'anticòs biotinitat, i s'hi afegeix una solució substrat amb TMB, la qual desenvolupa color en proporció a la quantitat de IGFBP-2 que s'hi ha unit. Finalment s'afegeix la solució Stop, que canvia el color de blau a groc, i es mesura la intensitat del color a 450 nm.

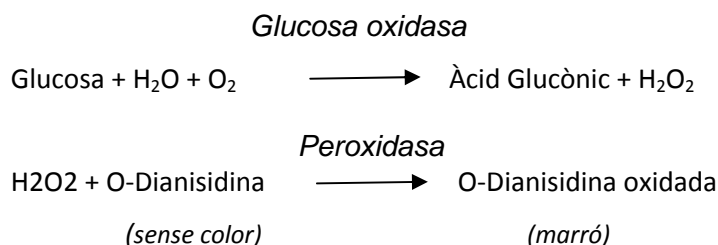
Determinació de metabòlits hepàtics

Glicogen

Els dipòsits hepàtics de glicogen es van quantificar seguint un mètode basat en la precipitació bàsica del glicogen seguida d'una hidròlisi àcida per a, finalment quantificar la glucosa alliberada. El procediment és el següent:

1. Es pren una peça de fetge conservat a -80°C d'entre 50 i 60 mg. Es pesa i se n'anota el pes exacte. Durant aquest procés, per evitar la descongelaçió, les peces es mantenen en Eppendorfs submergits en $\text{N}_{2(l)}$ o en neu carbònica.
2. Posem la peça en un tub tipus Falcon de 15 ml que conté 0.5 ml de KOH 30%.
3. Es bull (bany Maria) durant 1 o 2 hores. Aquesta extracció alcalina ens permet separar el glicogen de la glucosa exògena en el posterior pas de precipitació amb etanol.
4. Ho deixem atemperar.
5. Afegim 5 ml d'Etanol 100% i seguidament 10 μl de LiCl 4M.
6. Ho vortegem bé i a continuació es deixa precipitar durant la nit en repòs a 4°C .
7. Ho centrifuguem 30 minuts a 3000 g. El glicogen es troba al precipitat, per tant, descartem el sobrenedant.

8. Es resuspèn el glicogen en 0.5 ml de HCl 4M.
9. Es bullen les mostres entre 30 i 90 minuts per a resolubilitzar.
10. Es deixa atemperar i es neutralitza amb 0.5 ml de K₂CO₃ 4M. Es comprova que el pH estigui entre 6.5 i 7.5 amb tires indicadores.
11. La concentració de glucosa alliberada per la hidròlisi àcida del glicogen es mesura fent servir un kit de mesura de glucosa (Sigma) basat en l'acoblament de les següents reaccions enzimàtiques:



Es duu a terme la reacció en una placa de 96 pouets on carreguem 2 µl de mostra/patró de glucosa i hi afegim 200 µl de la solució d'assaig que conté els enzims. Després d'una incubació de 30 min a 37°C, es mesura la intensitat de la coloració a una longitud d'ona de 425-475 nm en un lector de plaques. La intensitat mesurada és proporcional a la concentració de glucosa.

TAG

S'han determinat el contingut hepàtic de triglicèrids seguint un procediment basat en el mètode de saponificació hepàtica de Salmon i Flatt [467].

1. Es pesen peces de fetge (conservat a -80°C) de 100-200 mg i se n'anota el pes. Durant aquest procés, per evitar la descongelaçió, les peces es mantenen en tubs Eppendorfs submergits en en N_{2(l)} o en neu carbònica.
2. S'afegeix el mateix volum (mg/µl) de 3M KOH (en 65% etanol) i es vorteja vigorosament per assegurar que tota la peça queda ben impregnada i al fons del tub Eppendorf.
3. S'inicia la digestió bàsica incubant a 70°C durant una hora i es continua la digestió durant la nit, en agitació a temperatura ambient.
4. L'endemà, es dilueixen les mostres de manera que la concentració final sigui 100 mg de teixit en 500 ml de Tris-HCl 50 mM. Per aconseguir-ho s'usa un estoc de Tris-HCl 2M.
5. Finalment, es mesura la concentració de TAG de l'homogenat amb el kit Triglyceride (GPO-Trinder) de Sigma, el qual es basa en una sèrie de reaccions acoblades (com que hem seguit aquest protocol de digestió dels TAG en medi bàsic podem evitar-nos la digestió dels TAG per la Lipoprotein Lipasa que conté el Kit). Després d'una sèrie de reaccions successives catalitzades per la Glicerol Kinasa (GK), Glicerol fosfat oxidasa (GPO) i peroxidasa (POD) s'obté un producte final que és un cromòfor que es pot quantificar espectrofotomètricament. La reacció es duu a terme en una placa de 96 pouets on carreguem 2 µl de mostra/patró de glicerol i hi afegim 200 µl de la solució d'assaig que conté els enzims. Després d'una incubació de 5 min a 37°C, es mesura la intensitat de la coloració (és proporcional a la quantitat de glicerol que prové dels TAG) a una longitud d'ona de 550 nm en un lector de plaques.

Lactat

La determinació de lactat al fetge es realitzà emprant el mètode descrit per Gutmann i Wahlefeld (1974). En aquest mètode, l'addició de l'enzim L-lactat deshidrogenasa (LDH) a la mostra transforma el substrat a piruvat al mateix temps que es dona la reducció del NAD^+ present a la reacció a NADH.

1. Es pesa un tros de teixit i s'homogeneïtza amb 5 volums de HClO_4 al 10% (per exemple, si la peça de fetge pesa 100 mg s'afegeixen 500 μl de HClO_4 10%).
2. L'homogenat es centrifuga durant 20 min a 20.000 g a 4°C.
3. Es recull el sobrenedant i se'n separen 200 μl , els quals es neutralitzen amb K_2CO_3 4N.
4. Es centrifuga durant 10 min a 20.000 g a 4°C per tal de precipitar les sals que s'han format durant la neutralització. Recuperem el sobrenedant per a la determinació de lactat (NOTA: aquests homogenats poden ésser conservats a -20°C i ésser utilitzats per a la determinació de glucosa-6-fosfat i glucosa lliure).
5. La determinació del lactat de l'homogenat neutralitzat es pot realitzar en una placa de 96 pouets.
 - Posem 10 μl de patró de lactat (Sigma) als pouets corresponents (62.5, 125, 250, 500 i 1000 μM)
 - Posem 10 μl de mostra neutralitzada als pouets corresponents (normalment fem duplicats o triplicats).
 - Afegim 200 μl de solució d'assaig a cada pou.

Solució d'assaig per determinar lactat	
Hidrazina sulfat 0.3125 M Glicina 0.875 M	} pH 9.5 (amb NaOH 1M)
NAD^+ 2.5 mM *	
EDTA 0.19 mM *	

* Aquesta solució d'assaig es pot preparar amb antelació i conservar a 4 °C, però el NAD^+ i l'EDTA s'han d'afegir al moment de l'assaig.

- Es quantifica l'absorbància dels pouets a 340 nm en un lector de plaques. Serà el punt 0 ($A_{0\text{min}}$).
- Es prepara una dilució 1/4 de LDH (*Lactate DeHydrogenase*) comercial (Roche, 5 mg/mL, 550 U/mg) amb aigua miliQ. Se n'afegeixen 25 μl a cada pou. Important, aquesta addició ha de ser ràpida per tal de minimitzar la diferència de temps entre pouets (s'aconsella utilitzar la pipeta multicanal).
- S'incuba la placa durant 15-20 min a temperatura ambient. Durant aquest temps té lloc la reacció enzimàtica. La hidrazina i el medi alcalí de l'assaig són necessaris per evitar que la reacció es desplaci cap a la formació de lactat, ja que el piruvat que es forma a partir del lactat de la mostra reacciona amb l'hidrazina per a formar hidrazona i d'aquesta manera la reacció es fa irreversible.
- Es quantifica l'absorbància dels pouets a 340 nm en un lector de plaques. Serà el punt final ($A_{20\text{min}}$).

- Es calcula la concentració de lactat de les mostres de la següent manera: es resta l'absorbància $A_{20\text{min}} - A_{0\text{min}}$, es dibuixa la recta patró (Absorbància vs Concentració) i se n'extrapola la concentració de les mostres. Finalment, s'expressen els resultats com a μmol de lactat / mg de fetge.

Glucosa 6 P

La glucosa-6-fosfat es va mesurar seguint el mètode de Lang & Michal (1974), basat en la reacció catalitzada per la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa. Aquest enzim transforma la glucosa 6-fosfat en 6-fosfogluconat i alhora redueix el NAD^+ a NADH el qual es pot detectar per fluorescència.

- Es pesa un tros de teixit i s'homogeneïtza amb 5 volums de HClO_4 al 10% (per exemple, si la peça de fetge pesa 100 mg s'afegeixen 500 μl de HClO_4 10%).
- L'homogenat es centrifuga durant 20 min a 20.000 g a 4°C.
- Es recull el sobrenedant i se'n separen 200 μl , els quals es neutralitzen amb K_2CO_3 4N.
- Es centrifuga durant 10 min a 20.000 g a 4°C per tal de precipitar les sals que s'han format durant la neutralització. Recuperem el sobrenedant per a la determinació de la glucosa-6-fosfat (NOTA: aquests homogenats poden ésser conservats a -20°C i ésser utilitzats per a la determinació de lactat i glucosa lliure).
- La determinació del lactat de l'homogenat neutralitzat es pot realitzar en una placa *COSTAR 3603* de 96 pouets mitjançant un lector de microplaques Fluostar optima (bmg) amb sistema d'injecció i regulació de temperatura.
 - Posem 60 μl de patró de glucosa-6-fosfat (Sigma) als pouets corresponents (entre 0.1 – 50 nmols/pou).
 - Posem 60 μl de mostra neutralitzada als pouets corresponents (normalment fem duplicats o triplicats).
 - Afegim 137.5 μl de solució d'assaig a cada pou:

Solució d'assaig	Comentaris
Tris-HCl 0.2M pH 7.6	Es pot preparar una solució estoc 10X (Tris-HCl 2M pH 7.6, EDTA 50 mM, MgCl_2 50 mM) i conservar-la a 4°C.
EDTA 5 mM	
MgCl_2 5 mM	
NADP^+ 0.2 mM	S'afegeix en fresc, al moment
Aigua miliQ	

- Posem la placa dins del lector de plaques per tal que s'atemperi a 37°C durant 5 min.
- Es realitza una lectura de fluorescència a una λ_{exc} de 340 nm i una λ_{emis} de 465 nm. Serà el punt 0 ($F_{0\text{min}}$).
- A continuació, es prepara una dilució 1/100 d'una solució comercial de G6P-DH (glucosa-6-fosfat deshidrogenasa) aïllada de *Leuconostoc mesenteroides* (Roche). S'injecten 3.5 μl d'aquesta dilució a cada pouet per tal que hi hagi al voltant 0.17 U/ml de G6P-DH. Immediatament s'inicia la lectura de la fluorescència a una λ_{exc} de 340 nm i una λ_{emis} de 465 nm, cada 15 segons durant 2 minuts.

6. Per fer els càlculs es resta la F_{0min} de cada pouet als valors obtinguts durant la reacció. Es calculen els pendents de cada pou. Es dibuixa la recta patró (pendent versus concentració) i se n'extrapola la concentració de les mostres. Finalment, s'expressen els resultats com a nmol de glucosa-6-fosfat / mg de fetge.

Glucosa lliure

1. Es pesa un tros de teixit i s'homogeneïtza amb 5 volums de $HClO_4$ al 10% (per exemple, si la peça de fetge pesa 100 mg s'afegeixen 500 μ l de $HClO_4$ 10%).
2. L'homogenat es centrifuga durant 20 min a 20.000 g a 4°C.
3. Es recull el sobrenedant i se'n separen 200 μ l, els quals es neutralitzen amb K_2CO_3 4N.
4. Es centrifuga durant 10 min a 20.000 g a 4°C per tal de precipitar les sals que s'han format durant la neutralització. Recuperem el sobrenedant per a la determinació de la glucosa (NOTA: aquests homogenats poden ésser conservats a -20°C i ésser utilitzats per a la determinació de lactat i glucosa-6-fosfat).
5. Es determina la concentració de glucosa mitjançant el kit de mesura de glucosa (Sigma) que ha estat descrit en aquesta tesi a l'apartat de la determinació de glicogen hepàtic. Breument, es realitza en una placa de 96 pous on es posa 2 μ l de mostra o patró a cada pou, s'hi afegeixen 200 μ l de solució d'assaig i s'incuba durant 30 min a 37°C. Es llegeix l'absorbància a 450 nm i es fan els càlculs corresponents.

Fructosa-2,6-bisfosfat

La concentració de fructosa-2,6-bisfosfat (F2,6BP) en els extractes bàsics s'ha determinat espectrofotomètricament aprofitant la capacitat que té aquest metabòlit per activar la 6-fosfofructo-2-cinasa dependent de pirofosfat (Ppi-PFK) de tubercle de patata. Seguint el mètode descrit per Van Schaftingen (1982), a continuació tenen lloc dues reaccions acoblades consecutives que condueixen finalment a l'oxidació del NADH, la qual es pot seguir a una longitud d'ona de 340 nm i a 37 °C.

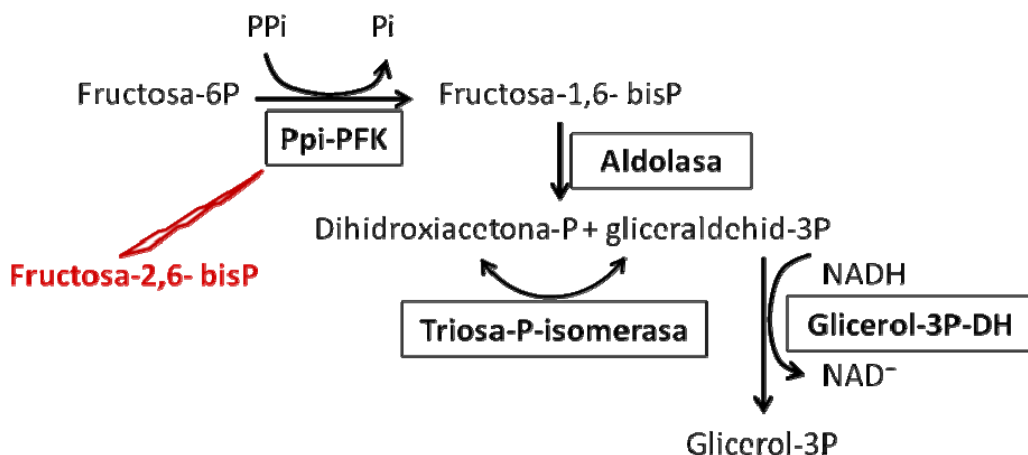


Figura 89. Esquema de les reaccions acoblades de l'assaig per a determinar la fructosa-2,6-bisfosfat.

Els resultats s'han calculat a partir d'una recta patró construïda amb F2,6BP (0,25-1 nM) i s'han expressat en pmol \times mg de proteïna-1.

Obtenció dels homogenats

1. Es pren aproximadament una peça de fetge (d'uns 100 mg) i s'homogeneïtza utilitzant una solució de NaOH 50 mM amb una relació pes:volum 1:10. Les mostres es conserven a pH alcalí fins el moment de la determinació. S'usa un pH alcalí perquè la fructosa-2,6-bisfosfat és extremadament làbil a pH àcid.
2. A l'hora de l'assaig, les mostres es sotmeten a 90°C durant 10 min per eliminar la fructosa-1,6-bP. Es manté en gel, se n'agafa una alíquota suficient per fer l'assaig (triplicats) i es centrifuga a 4°C durant 15 minuts a 20.000 g.
3. Es recupera el sobrenedant i es neutralitza amb acètic/acetat 250 mM pH 4 (acetat magnèsic 250 mM portat a pH 4 amb àcid acètic glacial). L'afegim de 3 µl en 3 µl, vortejant cada vegada fins a pH 7 – 8 (mai per sota de 7). Es va comprovant el pH amb tires reactives.
4. Es centrifuga la mostra neutralitzada durant 5 minuts a 4°C i a 20.000 g. Recuperem el sobrenedant per a la determinació de fructosa-2,6-bP (en cas necessari, es pot guardar a -80°C).

Preparació del material necessari per a l'assaig enzimàtic

- ◆ Tampó de reacció Tris/acetat (concentració final a una cubeta d'1ml): Tris/acetat 50 mM pH 7.8 – 8, acetat magnèsic 2 mM, NADH 0.15 mM (s'afegeix al moment).
- ◆ Substrats (concentració final a una cubeta d'1ml): fructosa-6-fosfat 5 mM i glucosa-6-fosfat 17.5 mM (lliures de fructosa-2,6-bisfosfat per tractament àcid).
- ◆ PPI-PFK de patata: aproximadament, 10mU/cubeta
- ◆ stock PPI (sal Na₄) 50 mM, .
- ◆ Enzims auxiliars dessalats: aldolasa 50 µg/ml (*stock*: 100 mg/10 mL, 9 U/mg), glicerol-3-fosfat deshidrogenasa i triosa-fosfat isomerasa (GDH/TIM) (*stock*: 10 mg/ml, 1550U/ml; i *stock*: 10 mg/ml, 4500 U/ml).
- ◆ Fructosa-2,6-bisfosfat en pols (sal Na₄) 3 mM preparada en aigua miliQ. Serveix per fer la recta patró. La fructosa-2,6-bisfosfat comercial pot contenir altres molècules i s'ha comprovat que la concentració real acostuma a ésser menor que la teòrica. S'aconsella comprovar la seva concentració real mitjançant l'assaig enzimàtic. Es pot conservar a -20°C.

Cal tenir en compte que es tracta d'un procediment casolà i cal preparar la majoria de reactius i enzims necessaris. Es detallen a continuació.

Preparació dels enzims auxiliars dessalats

L'aldolasa, la glicerol-3-fosfat deshidrogenasa (GDH) i la triosa-P-isomerasa (TIP) són enzims auxiliars necessaris per a l'oxidació del NADH acoblada a la quantitat de fructosa-2,6-bisfosfat que hi ha a la mostra. Es compren solucions comercials d'aquests enzims amb sulfat amònic, el qual ha d'ésser eliminat ja que interfereix en la determinació de fructosa-2,6-bP. Per dessalar es segueix el mètode de Penefski (1977).

1. S'agiten bé les ampolles d'enzims comercials abans de pipetejar. Per a 10 cubetes, pipetegem 50 µl d'aldolasa i 11 µl de GDH/TIM (caldrà ajustar les quantitats segons el nombre d'assajos que hem de realitzar). Centrifuguem la mescla a 18000 g durant 2 min a 4°C.
2. Descartem el sobrenedant i resuspenem el pellet amb 1V de tampó Tris/acetat.
3. En paral·lel, s'ha preparat les columnes per realitzar una cromatografia de filtració en gel: s'ha usat una xeringa d'1ml (sense l'èmbol) a la qual s'introdueix llana de vidre per

fer un tap a la part inferior. S'hi afegeix aproximadament 1 ml de Sephadex G-25 (preparat amb tampó Tris/acetat). Es disposen les xeringues dins d'un tub tipus *Falcon* de 15 ml i es centrifuguen durant 3 min a 2000 rpm i a 4°C. Es descarta l'eluit i es disposen les xeringues en tubs *Falcon* de 15 ml nets.

4. Es carrega fins a 70 µl de la barreja d'enzims (preparada als passos 1 i 2) a cada columna de Sephadex (preparada al pas 3). Es centrifuguen durant 3 min a 2000 rpm i a 4°C. Es recuperen els eluïts de tots els tubs i s'ajunten en un. Se'n mesura el volum i s'hi afegeix tampó Tris/acetat fins a un volum final de 450 µl (aquesta dada és per a 10 cubetes, caldrà ajustar la quantitat segons el nombre d'assajos a realitzar). Es conserva a 4°C.

S'aconsella dessalar els enzims auxiliars just abans de l'assaig, tot i que també es poden conservar a 4°C un cop dessalats.

Semi-purificació de PPI-PFK de patata (*Solanum tuberosum*)

1. Es pelen les patates, es tallen a trossets i es disposen en paper d'alumini sobre gel. S'aconsella usar patates velles.
2. Es pesen les patates (al voltant de 165 g), s'anota el pes per tal d'ajustar els volums al pes.
3. Immediatament es pica la patata en un aparell tipus Omni Mixer 2 durant 2 min a 9500 rpm (alternativament, es pot usar una liquadora domèstica) fins obtenir una textura de puré fi.
4. S'ajunten la polpa i el líquid obtinguts durant la trituració en un vas de precipitats col·locat en el gel.
5. Ràpidament s'afegeixen 2V (volums) de tampó Hepes/AcCOOK/DTT.

Tampó Hepes/AcCOOK/DTT pH 8.2
Hepes 20 mM
Acetat de potassi 20 mM
DTT 2mM (s'afegeix al moment)

6. Es filtra amb gases o tela fina (seda) sobre un embut disposat sobre una proveta. Nota: les gases han d'estar disposades en orientacions diferents de manera que tinguem una mena de teixit de porus petit. Al final de la filtració, es pot remoure el material que no s'ha filtrat amb una espàtula, agafar les gases amb les mans (guants), fer com un saquet i espremer per acabar d'escórrer el volum residual. Es mesura la quantitat de líquid filtrat i s'anota el volum.
7. Es buida el filtrat en un recipient tipus vas de precipitats pre-refredat.
8. S'hi afegeix $MgCl_2$ (solució mare 1M) per tenir una concentració final de 2 mM i PPI (sòlid) per tenir una concentració final de 2 mM (per fer els càlculs tenim en compte el volum que hem anotat al pas 6).
9. Es dissol bé amb l'ajuda d'un agitador magnètic, mentre mantenim el recipient en gel. Anem mesurant el pH de tant en tant, fins que el pH s'estabilitza (normalment triga uns 10 min i el pH ~ 7.6)
10. S'ajusta el pH a 8.2 amb KOH 1M (anotem el volum afegit), mantenint el recipient fred en gel.
11. Passem el recipient a un bany d'aigua a 70°C. La temperatura de la solució anirà pujant. Cal controlar contínuament la temperatura de la solució fins assolir els 59°C.

- Aleshores, cal mantenir aquests 59°C durant 5 minuts (posant i traient el vas de precipitats del bany). És molt important que la temperatura no baixi ni pugi durant aquests 5 minuts per tal d'evitar la degradació de l'enzim.
12. Refredem ràpidament el recipient en gel. S'ajusta el pH a 7 amb HCl 1M (anotem el volum afegit), mantenint el recipient fred en gel.
 13. Afegim PEG-6000 a una concentració final del 6% (tenint el compte el volum final = volum mesurat al pas 6 + volum KOH 1M afegit al pas 10 + volum HCl 1M afegit al pas 12). El recipient continua estant en gel.
 14. Es manté la solució en agitació suau durant 15 min a 4°C.
 15. Es deixa reposar durant 10 min a 4°C.
 16. Es reparteix la solució en tubs i es centrifuguen a 4000 g durant 10 min a 4°C.
 17. Després de la centrifugació veurem un pellet de 2 capes: una capa interna més blanca i una capa externa groga més tova. És essencial rascar aquesta part groga i resuspendre-la en el sobrenedant. Ens quedem amb el sobrenedant i la capa groga. Anotem el volum.
 18. Afegim PEG-6000 a una concentració final del 10% (tenint en compte el volum anotat al pas 17) i ho mantenim en gel.
 19. Es manté la solució en agitació suau durant 15 min a 4°C.
 20. Es deixa reposar durant 10 min a 4°C.
 21. Es reparteix la solució en tubs i es centrifuguen a 4000 g durant 10 min a 4°C.
 22. Es descarta el sobrenedant. Es resuspèn el precipitat amb 15-20 ml de tampó Tris/KCl/DTT, sempre treballant en gel.

Tampó Tris/KCl/DTT pH 8.2
Tris 20 mM
KCl 20 mM
DTT 2 mM (s'afegeix al moment)

23. S'afegeix 1V de glicerol 100%, lentament.
24. Es fan alíquotes en tubs d'1 ml a la cambra freda, mentre mantenim tots els tubs en gel. Es poden conservar a -80°C durant un període llarg de temps sense pèrdues importants d'activitat.

Assaig enzimàtic

Preparem les cubetes seguint l'ordre indicat en aquesta taula:

	Blanc	Patró	Mostres
Tampó Tris/acetat	750 µl (sense NADH)	750 µl (amb NADH)	750 µl (amb NADH)
Enzims auxiliars	-	50 µl	50 µl
Substrats	-	50 µl	50 µl
Aigua miliQ	150 µl *	X µl (per arribar a 1 ml) *	110 µl *
Patró / mostra	-	0, 1, 2, 4, 6, 7 pmol	30 µl *
PPi-PFK **	10 µl *	10 µl	10 µl
PPi **	50 µl	50 µl	50 µl

* Cal ajustar les quantitats per a cada tipus de mostra i segons com hagi funcionat la purificació de PPI-PFK. ** És important agitar bé després d'afegir la PPI-PFK i també després d'afegir el PPI.

Immediatament s'inicia la lectura a una longitud d'ona de 340 nm durant 10 minuts cada 20 segons en un espectrofotòmetre DU 800 Beckman Coulter a 30°C. Si hi ha fructosa-2,6-bisfosfat es perfila un pendent negatiu, degut a la desaparició de NADH.

Amb els pendents de cada punt de la patró de fructosa-2,6-bisfosfat es dibuixa la recta (pendent *versus* concentració) i se n'extrapola la concentració de les mostres. Finalment, s'expressen els resultats com a pmol de fructosa-2,6-bisfosfat / mg de fetge.

Nucleòtids intracel·lulars (ATP, ADP, AMP)

La quantificació dels nucleòtids intrahepàtics es va realitzar per HPLC a les instal·lacions dels Serveis Científico-Tècnics del Campus de Pedralbes, Universitat de Barcelona, seguint el protocol següent:

1. S'obtenen homogenats hepàtics en HClO₄ 10%. Tot el procés es duu a terme en fred.
2. Es neutralitzen els extractes amb K₂CO₃ 5M.
3. Es clarifiquen els extractes mitjançant una centrifugació en columnes Ultracel YM-10 (Millipore) durant 30 minuts a 12.000 g a 4°C.
4. Les mostres es guarden a -80°C fins l'anàlisi.
5. L'anàlisi dels nucleòtids es va realitzar injectant 40 µl de mostra en una columna d'intercanvi iònic Whatman Partisil 10-SAX i aplicant un gradient lineal de NH₄H₂PO₄ 5 mM, pH 2.5 (Tampó A) i NH₄H₂PO₄ 500 mM, pH 3.9 (Tampó B). El gradient es va realitzar de 0% a 100% de Tampó B en un període de 40 minuts a un flux de 1 ml/min.

Glutatió oxidat i glutatió reduït (GSH/GSSG)

Els continguts cel·lulars de glutatió reduït (GSH) i de glutatió oxidat (GSSG) s'han determinat fluorimètricament mitjançant la derivatització amb el fluoròfor OPA (*o-phthalaldehyde*) seguint el protocol proposat per Stocchi (1985).

Preparació de les mostres

1. Es pren una peça de fetge conservat a -80°C, es pesa i s'homogeneïtza en 9V de HClO₄ al 10% (per ex. si pesa 100 mg, calen 900 µl).
2. Es centrifuga l'homogenat a 12000 g durant 5 min a 4°C. Es recupera el sobrenedant. (Si no es pot continuar el protocol, aquest sobrenedant pot conservar-se a -80°C)
3. Es clarifiquen els extractes mitjançant una centrifugació en columnes Ultracel YM-10 (Millipore) durant 30 minuts a 12.000 g a 4°C (per als assajos de GSH i GSSG caldrà un mínim de 150 µl de mostra).

Preparació dels reactius

- ◆ Tampó RQB (Redox Quenching Buffer, Solució d'apantallament redox): HCl 20 mM, DTPA (àcid dietilentriaminopentaacètic) 5 mM, àcid ascòrbic 10 mM.
- ◆ Solució HClO₄-RQB: 10% de HClO₄ preparat en RQB.

- ◆ Solució de N-etilmaleïmida (NEM) a 7.5 mM en tampó RQB. El NEM segresta el GSH i ens permetrà determinar la fluorescència no dependent de glutatió.
- ◆ Solució amortidora de fosfats a 1M. Es prepara barrejant les solucions KH_2PO_4 1M i K_2HPO_4 1M fins arribar a pH 7 (orientativament, es barregen 15 ml de KH_2PO_4 1M i 28 ml de K_2HPO_4 1M).
- ◆ Solució d'*o-phthalaldehyde* (OPA) a 5 mg/ml en metanol. S'aconsella preparar-la al moment i mantenir-la en gel. Atenció: cal manipular l'OPA amb guants i mascareta.
- ◆ Solució de ditionit sòdic ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 100 mM en solució RQB. Es prepara al moment i es manté en gel.
- ◆ Patró de GSH: amb GSH en pols es prepara una solució *stock* de GSH 100 mM a partir de la qual s'obtenen punts dins del rang 1000-2.5 μM .

Mesura del GSH

1. Per a cada mostra es realitzaran dues mesures: una de la fluorescència del glutatió (B) i l'altra del *background* (A). Es preparen les mostres en tubs tipus *ependorf*. Es fan duplicats o triplicats de cada mesura.

	A	B
Mostra / Patró	5 μl	5 μl
Solució HClO_4-RQB	25 μl	25 μl
NEM	4 μl	-
RQB	-	4 μl
Tampó fosfat 2M	50 μl	50 μl
Incubació	5 min a temp. ambient	5 min a temp. ambient
Tampó fosfat 0.2 M	200 μl	200 μl
OPA	30 μl	30 μl
Incubació	30 min a les fosques i a temp. ambient	30 min a les fosques i a temp. ambient

2. Com que durant el procés es formen sals, cal fer un pas de centrifugació a 1400 rpm durant 5 min a 4 °C per precipitar-les. Es recupera el sobrenedant.
3. Es disposen els sobrenedants (el mateix volum per a totes les mostres i patrons, 270 μl) en una placa negra tipus *COSTAR 3603* de 96 pouets.
4. Es mesura la intensitat de la fluorescència de l'OPA a una λ_{exc} de 365 ± 5 i una λ_{emis} de 430 ± 20 nm en un lector de microplaques *Fluostar optima*.

Es realitza el càlcul restant la fluorescència del tub A a la fluorescència de la mostra (tub B). Els resultats s'han calculat a partir d'una recta patró construïda amb solucions de GSH nmol / mg teixit.

Mesura del GSSG

En la determinació de GSSG de les mostres primer s'addiciona NEM a tots els tubs. El NEM s'uneix al GSH present a les mostres i el segresta. Es continua amb el protocol fins que s'afegeix ditionit sòdic als tubs B i RQB als tubs A. El ditionit dels tubs B redueix el GSSG de les mostres a GSH. Per tant, mesurarem el GSSG present a les mostres transformant-lo prèviament a GSH. Per aquest motiu, s'utilitza la mateixa recta patró que en la determinació de GSH i no afegirem ditionit sòdic als tubs on hi ha la patró.

1. Per a cada mostra es realitzaran dues mesures: una de la fluorescència del glutatió (B) i l'altra del *background* (A). Es preparen les mostres en tubs tipus *ependorf*. Es fan duplicats o triplicats de cada mesura.

	A	B
Mostra / Patró	15 µl	15 µl
NEM	4 µl	4 µl (no als tubs de patró)
Tampó fosfat 2M	50 µl	50 µl
Incubació	5 min a temp. Ambient	5 min a temp. ambient
Na₂S₂O₄	-	6 µl
RQB	6 µl	-
Incubació	1h a les fosques i a temp. Ambient	1h a les fosques i a temp. ambient
Tampó fosfat 0.2 M	200 µl	200 µl
OPA	30 µl	30 µl
Incubació	30 min a les fosques i a temp. Ambient	30 min a les fosques i a temp. ambient

2. Com que durant el procés es formen sals, cal fer un pas de centrifugació a 1400 rpm durant 5 min a 4 °C per precipitar-les. Es recupera el sobrenedant.
3. Es disposen els sobrenedants (el mateix volum per a totes les mostres i patrons, 270 µl) en una placa negra tipus *COSTAR 3603* de 96 pouets.
4. Es mesura la intensitat de la fluorescència de l'OPA a una λ_{exc} de 365 i una λ_{emis} de 430 nm en un lector de microplaques *Fluostar optima*.

Es realitza el càlcul restant la fluorescència del tub A a la fluorescència de la mostra (tub B). Els resultats s'han calculat a partir d'una recta patró construïda amb solucions de GSH nmol / mg teixit.

Determinació de leptina en extractes de teixit adipós

Es va homogeneïtzar el teixit adipós en tampó d'homogeneïtzació (100 mM NH₄HCO₃, 10 mM EGTA, 10 mM EDTA, pH 9.3), amb l'ajuda del Potter i es va centrifugar l'homogenat a 5000 g durant 20 minuts. Per determinar la leptina dels homogenats, es van haver de diluir 1000 vegades i es va emprar el Kit RayBio® Mouse Leptin ELISA Kit.

DETERMINACIONS BIOFÍSQUES

Respirometria d'alta resolució

Hem emprat la tècnica de respirometria d'alta resolució per a 2 tipus de mesures. En el cas dels ratolins Balb/c injectats amb pGK i pGK_{A456V}, es va determinar l'estat mitocondrial a partir de biòpsies de fetge. Per altra banda, es va avaluar la capacitat d'oxidació de glucosa d'hepatòcits aïllats de ratolins diabètics transfectats amb pGK i pGK_{A456V}.

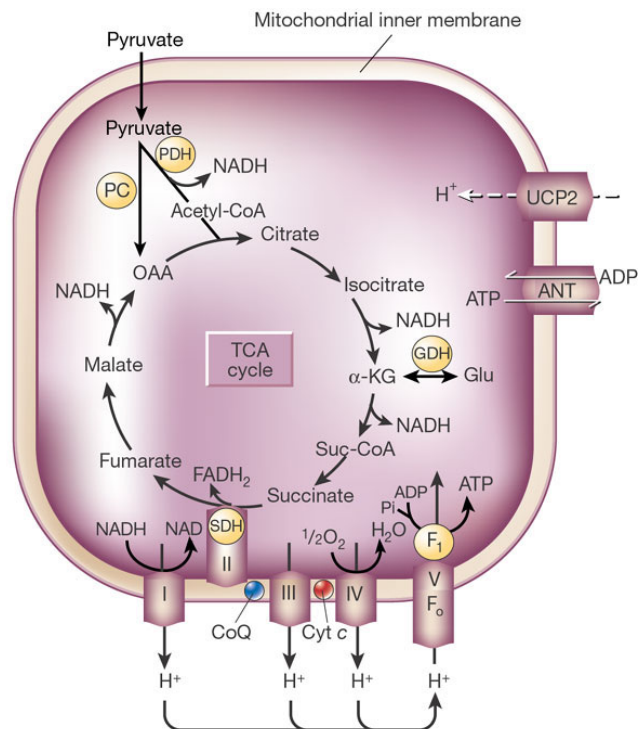


Figura 90. Representació de la cadena respiratòria mitocondrial.

En els dos casos, la mesura polarogràfica del consum d'oxigen de les mostres s'ha dut a terme a 37°C amb un elèctrode d'oxigen d'alta resolució del tipus Oxygraph (Oroboros, Austria) amb l'agitació fixada a 750 rpm. L'oxigen dissolt al medi d'incubació difon a través d'una membrana de tefló i es redueix en posar-se en contacte amb l'elèctrode de platí polaritzat a 0.6 V, generant-se un corrent elèctric proporcional a l'activitat d'oxigen de la solució. El protocol complet es va finalitzar en un període de 50-60 minuts, emmagatzemant les mesures de concentració i consum d'oxigen a intervals de 2 segons utilitzant un sistema d'adquisició de dades informatitzat (Datlab, Austria).



Figura 91. Imatge del respiròmetre d'alta resolució (Oroboros, Àustria).

Avaluació de l'estat mitocondrial a partir de biòpsia de fetge

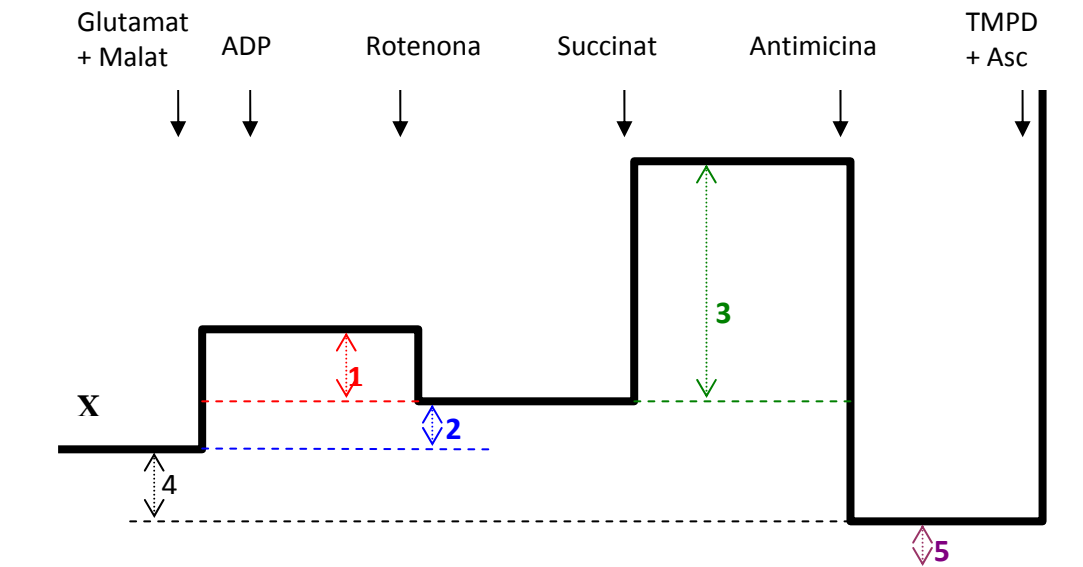
Un cop s'ha sacrificat l'animal i s'ha realitzat la laparotomia, s'extreu un tros de fetge i es submergeix ràpidament en medi de respirometria MiR05 (*mitochondrial respiration medium*) pre-refredat. A continuació es talla una peça de teixit d'1 mm³.

Mitochondrial Respiration Medium MiR05
EGTA 0.5 mM
MgCl ₂ · 6 H ₂ O 3 mM
K-lactobionat 60 mM
Taurina 20 mM
KH ₂ PO ₄ 10 mM
HEPES 20 mM
Sacarosa 110 mM
BSA fracció V (lliure d'àcids grassos) 1g/L
S'ajusta a pH 7.1 amb KOH 5M.
Es pot conservar a -20°C

Abans de començar les mesures, cal equilibrar el medi de respirometria amb aire a 37 °C i agitació a 750 rpm fins que s'obté un senyal estable per a la calibració en condicions saturants d'aire. A partir d'aquest moment es pot introduir la mostra i començar les mesures. Es van injectar els diferents substrats i inhibidors de la cadena respiratòria mitjançant xeringues del tipus *Hamilton*, seguint l'ordre detallat a continuació:

- Glutamat/Malat: permeten l'entrada de NADH al mitocondri i, per tant, proporcionen el substrat pel complex I de la cadena respiratòria. Permet avaluar la respiració basal.
- ADP: és el substrat pel complex V, altrament dit ATPasa, per tal que l'ATPasa vagi al màxim -
- Rotenona: Inhibeix el complex I
- Succinat: substrat del complex II)
- Antimicina-A 5 µM: inhibeix el complex III i ocasiona una aturada de la respiració.
- TMPD 500 µM + Ascorbat 2 mM: TMPD és el donador d'electrons al citocrom c, i ascorbat és el substrat del complex IV. Permet avaluar l'activitat citocrom c oxidasa (COX), la qual es pot fer servir com a normalitzador intern.

A continuació es mostra un esquema teòric del procés de respirometria i de com interpretar les dades.



X. ens dóna la respiració basal, la qual correspon al consum d'oxigen degut a:

- desacoblament
- respiració extramitocondrial
- auto-oxidació

1. Respiració deguda al **complex I**: ja que hem afegit glutamat i malat (donadors de NADH al complex I) i a més a més, hem afegit ADP per tal que hi hagi prou substrat per al complex V i així puguem tenir una respiració acoblada a la formació d'ATP. Aquesta respiració s'atura en afegir la rotenona, la qual inhibeix el complex I. Per tant, la respiració del complex I correspon a la resta entre el valor de consum d'oxigen en presència de glutamat+malat i ADP i el consum d'oxigen en presència de rotenona.

2. Després d'afegir rotenona, no es retorna al valor de respiració X, ja que hi pot haver pèrdua d'electrons de la cadena respiratòria, fenomen conegut amb el nom de *leakage*.

3. En afegir succinat, podem valorar la respiració deguda al **complex II**. L'aturem en afegir antimicina, la qual bloqueja totalment la respiració perquè bloqueja el complex III. La respiració deguda al complex II, seria la deguda exclusivament a l'addició de succinat, per tant, la resta entre el consum d'oxigen en presència de succinat i el consum d'oxigen en presència de rotenona.

4. La diferència de consum d'oxigen basal inicial i en presència d'antimicina-A (quan hi ha bloqueig total de la cadena respiratòria) ens dóna una estimació del grau de desacoblament entre trànsit a la cadena respiratòria i síntesi d'ATP. Per fer-ho bé, caldria afegir oligomicina (inhibidor de l'ATP sintasa).

5. Quan la cadena respiratòria està inhibida amb l'antimicina-A, el consum d'oxigen que s'observa és degut a **processos extramitocondrials i processos d'auto-oxidació**.

En afegir TMPD i ascorbat, podem obtenir el valor de respiració que és indicatiu del nombre de cadenes respiratòries que hi ha funcionant (activitat COX). L'hem emprat com a normalitzador. A l'hora de fer els càlculs, s'ha restat el consum d'oxigen amb antimicina-A de les dades brutes del consum d'oxigen amb glutamat+ADP, amb rotenona, amb succinat i amb TMPD+ascorbat.

Aquesta resta permet prescindir del consum d'oxigen dels processos extramitocondrials i d'auto-oxidació a l'hora de valorar el consum d'oxigen propi dels complexos de la cadena respiratòria.

A la pràctica però, per diferències de calibració del respiròmetre, ens va resultar impossible avaluar el "*leakage*."

TÈCNIQUES DE BIOLOGIA CEL·LULAR

Separació de nuclis i citoplasma

El protocol estàndard en realitzar un xoc hipotònic per trencar la membrana cel·lular i així recuperar la fracció citosòlica. A continuació, amb un xoc hipertònic es trenca la membrana nuclear per obtenir la fracció nuclear. El protocol estàndard emprava una solució amb KCl per exercir la pressió osmòtica. No obstant, com que el KCl promou la separació del complex GK-GKRP que és l'objecte del nostre estudi, vam canviar el KCl per NaCl per no interferir en el resultat.

Partiem de cèl·lules cultivades en plaques de 10 cm de diàmetre:

- Fer 2 rentats amb PBS fred.
- Recollir les cèl·lules en 1 ml de PBS fred (*scrapping*) i posar-les en un tub tipus eppendorf.
- Centrifugar-les durant 1 minut a 500-1000 rpm a 4°C, i descartar el sobrenedant (és important separar bé el sobrenedant per tal d'eliminar al màxim les sals, ja que si no fos així, en afegir la solució A no s'assolirien condicions hipotòniques).
- Afegir 0.4 ml de solució A i deixar-ho en gel durant 20 minuts, durant els quals es faran 3-4 cops de vòrtex fort. NOTA: per obtenir millors resultats és preferible emprar volums majors de solució A per afavorir la lisi de la membrana cel·lular; nosaltres el vam reduir perquè volíem que l'extracte citosòlic obtingut no estigués massa diluït.

Solució A
Hepes-KOH 10 mM pH 7.9
MgCl ₂ 1.5 mM
NaCl 10 mM (a l'original era KCl 10 mM)
<i>Barreja d'inhibidors de proteases i fosfatases:</i>
Benzamidina 100 µg/ml
Leupeptina 100 µg/ml
NaF 50 mM
B-glicerofosfat 40 mM
Na ₃ VO ₄ 1 mM
DTT 2 mM
PMSF 100 mM

- Centrifugar durant 5 minuts a 1000 g i a 4°C. El sobrenedant obtingut és l'**extracte citosòlic**.
- Opcional: afegir sobre del *pellet* 0.2 ml de solució A, vortejar i deixar 5 minuts en gel. A continuació centrifugar durant 5 minuts a 1000 g i a 4°C. El sobrenedant obtingut es pot afegir a l'extracte citosòlic. NOTA: aquest pas serveix per rentar millor els nuclis i aprofitar les restes de citosol que hagin quedat.
- Afegir 50 µl de solució C sobre el *pellet* i deixar-ho reposar durant 20 minuts en gel. Passats aquests minuts, resuspendre-ho suaument colpejant els tubs amb els dits.

Solució C
Hepes-KOH 20 mM pH 7.9
MgCl ₂ 1.5 mM
NaCl 420 mM
Glicerol 25 %
EDTA 0.2 mM
<i>Barreja d'inhibidors de proteases i fosfatases:</i>
Benzamidina 100 µg/ml
Leupeptina 100 µg/ml
NaF 50 mM
B-glicerofosfat 40 mM
Na ₃ VO ₄ 1 mM
DTT 2 mM
PMSF 100 mM

- Centrifugar a velocitat màxima durant 5 minuts a 4°C. El sobrenedant obtingut és l'**extracte nuclear**.

BIBLIOGRAFIA

1. Drucker, D. J. (2007). The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest* 117: 24-32.
2. Hansotia, T., et al. (2007). Extrapancreatic incretin receptors modulate glucose homeostasis, body weight, and energy expenditure. *J Clin Invest* 117: 143-152.
3. Lam, T. K., et al. (2005). Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat Med* 11: 320-327.
4. Pocai, A., Obici, S., Schwartz, G. J., and Rossetti, L. (2005). A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metab* 1: 53-61.
5. Pocai, A., et al. (2005). Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 434: 1026-1031.
6. Bernal-Mizrachi, C., et al. (2007). An afferent vagal nerve pathway links hepatic PPARalpha activation to glucocorticoid-induced insulin resistance and hypertension. *Cell Metab* 5: 91-102.
7. Imai, J., et al. (2008). Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 322: 1250-1254.
8. Uno, K., et al. (2006). Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science* 312: 1656-1659.
9. Rosen, E. D., and Spiegelman, B. M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444: 847-853.
10. Lee, D. E., Kehlenbrink, S., Lee, H., Hawkins, M., and Yudkin, J. S. (2009). Getting the message across: mechanisms of physiological cross talk by adipose tissue. *American journal of physiology* 296: E1210-1229.
11. Ferrer, J. C., et al. (2003). Control of glycogen deposition. *FEBS Lett* 546: 127-132.
12. Bollen, M., Keppens, S., and Stalmans, W. (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J* 336 (Pt 1): 19-31.
13. Agius, L. (2008). Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* 414: 1-18.
14. Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P., and Foufelle, F. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12737-12742.
15. Hegarty, B. D., Bobard, A., Hainault, I., Ferre, P., Bossard, P., and Foufelle, F. (2005). Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 791-796.
16. Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B. S., Bashmakov, Y., and Horton, J. D. (1998). Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem* 273: 35299-35306.

17. Liang, G., Yang, J., Horton, J. D., Hammer, R. E., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2002). Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 277: 9520-9528.
18. Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J. D., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1999). Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13656-13661.
19. Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2004). Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11245-11250.
20. Peet, D. J., et al. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93: 693-704.
21. Repa, J. J., et al. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes & development* 14: 2819-2830.
22. Uyeda, K., and Repa, J. J. (2006). Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 4: 107-110.
23. Kabashima, T., Kawaguchi, T., Wadzinski, B. E., and Uyeda, K. (2003). Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5107-5112.
24. Decaux, J. F., Antoine, B., and Kahn, A. (1989). Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. *J Biol Chem* 264: 11584-11590.
25. Iizuka, K., Bruick, R. K., Liang, G., Horton, J. D., and Uyeda, K. (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7281-7286.
26. Dentin, R., et al. (2006). Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 55: 2159-2170.
27. Puigserver, P., et al. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423: 550-555.
28. Biggs, W. H., 3rd, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W. K., and Arden, K. C. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7421-7426.
29. Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., and Fukamizu, A. (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11285-11290.

30. Chakravarty, K., Wu, S. Y., Chiang, C. M., Samols, D., and Hanson, R. W. (2004). SREBP-1c and Sp1 interact to regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the liver. *J Biol Chem* 279: 15385-15395.
31. Wu, C., Okar, D. A., Newgard, C. B., and Lange, A. J. (2001). Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase in mouse liver lowers blood glucose by suppressing hepatic glucose production. *J Clin Invest* 107: 91-98.
32. Wu, C., Okar, D. A., Newgard, C. B., and Lange, A. J. (2002). Increasing fructose 2,6-bisphosphate overcomes hepatic insulin resistance of type 2 diabetes. *American journal of physiology* 282: E38-E45.
33. Wu, C., et al. (2004). A potential role for fructose-2,6-bisphosphate in the stimulation of hepatic glucokinase gene expression. *Endocrinology* 145: 650-658.
34. Massillon, D. (2001). Regulation of the glucose-6-phosphatase gene by glucose occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Differential effect of glucose and xylitol. *J Biol Chem* 276: 4055-4062.
35. Massillon, D., et al. (1998). Carbon flux via the pentose phosphate pathway regulates the hepatic expression of the glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase genes in conscious rats. *J Biol Chem* 273: 228-234.
36. Okamoto, Y., et al. (2007). Restoration of glucokinase expression in the liver normalizes postprandial glucose disposal in mice with hepatic deficiency of PDK1. *Diabetes* 56: 1000-1009.
37. Desvergne, B., Michalik, L., and Wahli, W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiological reviews* 86: 465-514.
38. Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434: 113-118.
39. Frescas, D., Valenti, L., and Accili, D. (2005). Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem* 280: 20589-20595.
40. Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Aoyama, H., Yoshimochi, K., and Fukamizu, A. (2005). Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11278-11283.
41. Quistorff, B., and Grunnet, N. (1987). Dual-digitonin-pulse perfusion. Concurrent sampling of periportal and perivenous cytosol of rat liver for determination of metabolites and enzyme activities. *Biochem J* 243: 87-95.
42. Quistorff, B., Grunnet, N., and Cornell, N. W. (1985). Digitonin perfusion of rat liver. A new approach in the study of intra-acinar and intracellular compartmentation in the liver. *Biochem J* 226: 289-297.
43. Chen, K. S., and Katz, J. (1988). Zonation of glycogen and glucose syntheses, but not glycolysis, in rat liver. *Biochem J* 255: 99-104.

44. Lindros, K. O., and Penttila, K. E. (1985). Digitonin-collagenase perfusion for efficient separation of periportal or perivenous hepatocytes. *Biochem J* 228: 757-760.
45. Aspichueta, P., Perez-Agote, B., Perez, S., Ochoa, B., and Fresnedo, O. (2006). Impaired response of VLDL lipid and apoB secretion to endotoxin in the fasted rat liver. *Journal of endotoxin research* 12: 181-192.
46. Jungermann, K. (1995). Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochemistry and cell biology* 103: 81-91.
47. Jungermann, K., and Katz, N. (1989). Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiological reviews* 69: 708-764.
48. Loud, A. V. (1968). A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *The Journal of cell biology* 37: 27-46.
49. Teutsch, H. F., Schuerfeld, D., and Groezinger, E. (1999). Three-dimensional reconstruction of parenchymal units in the liver of the rat. *Hepatology (Baltimore, Md)* 29: 494-505.
50. Braeuning, A., et al. (2006). Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *Febs J* 273: 5051-5061.
51. Krones, A., Jungermann, K., and Kietzmann, T. (2001). Cross-talk between the signals hypoxia and glucose at the glucose response element of the L-type pyruvate kinase gene. *Endocrinology* 142: 2707-2718.
52. Bartels, H., Freimann, S., and Jungermann, K. (1993). Predominant periportal expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in liver of fed and fasted mice, hamsters and rats studied by in situ hybridization. *Histochemistry* 99: 303-309.
53. Benhamouche, S., et al. (2006). Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Developmental cell* 10: 759-770.
54. Stanulovic, V. S., et al. (2007). Hepatic HNF4alpha deficiency induces periportal expression of glutamine synthetase and other pericentral enzymes. *Hepatology (Baltimore, Md)* 45: 433-444.
55. Sekine, S., Ogawa, R., McManus, M. T., Kanai, Y., and Hebrok, M. (2009). Dicer is required for proper liver zonation. *The Journal of pathology* 219: 365-372.
56. Eilers, F., Modaresi, S., and Jungermann, K. (1995). Predominant periportal expression of the fructose 1,6-bisphosphatase gene in rat liver: dynamics during the daily feeding rhythm and starvation-refeeding cycle. *Histochemistry and cell biology* 103: 293-300.
57. Tosh, D., Alberti, G. M., and Agius, L. (1988). Glucagon regulation of gluconeogenesis and ketogenesis in periportal and perivenous rat hepatocytes. Heterogeneity of hormone action and of the mitochondrial redox state. *Biochem J* 256: 197-204.

58. Wiegman, C. H., et al. (2003). Hepatic VLDL production in ob/ob mice is not stimulated by massive de novo lipogenesis but is less sensitive to the suppressive effects of insulin. *Diabetes* 52: 1081-1089.
59. Evans, J. L., Quistorff, B., and Witters, L. A. (1989). Zonation of hepatic lipogenic enzymes identified by dual-digitonin-pulse perfusion. *Biochem J* 259: 821-829.
60. Kinlaw, W. B., Tron, P., and Witters, L. A. (1993). Thyroid hormone and dietary carbohydrate induce different hepatic zonation of both "spot 14" and acetyl-coenzyme-A carboxylase: a novel mechanism of coregulation. *Endocrinology* 133: 645-650.
61. Guzman, M., and Castro, J. (1989). Zonation of fatty acid metabolism in rat liver. *Biochem J* 264: 107-113.
62. Guzman, M., Bijleveld, C., and Geelen, M. J. (1995). Flexibility of zonation of fatty acid oxidation in rat liver. *Biochem J* 311 (Pt 3): 853-860.
63. Twisk, J., et al. (1995). Heterogeneous expression of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase genes in the rat liver lobulus. *J Clin Invest* 95: 1235-1243.
64. Ugele, B., et al. (1991). Heterogeneity of rat liver parenchyma in cholesterol 7 alpha-hydroxylase and bile acid synthesis. *Biochem J* 276 (Pt 1): 73-77.
65. Katz, N. R., Fischer, W., and Giffhorn, S. (1983). Distribution of enzymes of fatty acid and ketone body metabolism in periportal and perivenous rat-liver tissue. *Eur J Biochem* 135: 103-107.
66. Braissant, O., Fougelle, F., Scotto, C., Dauca, M., and Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137: 354-366.
67. Orfila, C., Lepert, J. C., Alric, L., Carrera, G., Beraud, M., and Pipy, B. (2005). Immunohistochemical distribution of activated nuclear factor kappaB and peroxisome proliferator-activated receptors in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. *Histochemistry and cell biology* 123: 585-593.
68. Ogawa, H., Pitot, H. C., and Fujioka, M. (1994). Diurnal variation of the serine dehydratase mRNA level in rat liver. *Archives of biochemistry and biophysics* 308: 285-291.
69. Ogawa, H., and Kawamata, S. (1995). Periportal expression of the serine dehydratase gene in rat liver. *The Histochemical journal* 27: 380-387.
70. Colletti, M., et al. (2009). Convergence of Wnt signaling on the HNF4alpha-driven transcription in controlling liver zonation. *Gastroenterology* 137: 660-672.
71. Burke, Z. D., Reed, K. R., Pheasant, T. J., Sansom, O. J., Clarke, A. R., and Tosh, D. (2009). Liver zonation occurs through a beta-catenin-dependent, c-Myc-independent mechanism. *Gastroenterology* 136: 2316-2324 e2311-2313.
72. O'Sullivan, D., Brosnan, J. T., and Brosnan, M. E. (1998). Hepatic zonation of the catabolism of arginine and ornithine in the perfused rat liver. *Biochem J* 330 (Pt 2): 627-632.

73. Watford, M. (2000). Glutamine and glutamate metabolism across the liver sinusoid. *The Journal of nutrition* 130: 983S-987S.
74. Buhler, R., Lindros, K. O., Nordling, A., Johansson, I., and Ingelman-Sundberg, M. (1992). Zonation of cytochrome P450 isozyme expression and induction in rat liver. *Eur J Biochem* 204: 407-412.
75. McNaughton, L., et al. (2002). Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 17161-17166.
76. Zandieh Doulabi, B., et al. (2002). TR(beta)1 protein is preferentially expressed in the pericentral zone of rat liver and exhibits marked diurnal variation. *Endocrinology* 143: 979-984.
77. Krones, A., Kietzmann, T., and Jungermann, K. (2000). Perivenous localization of insulin receptor protein in rat liver, and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocyte cultures. *Biochem J* 348 Pt 2: 433-438.
78. Krones, A., Kietzmann, T., and Jungermann, K. (1998). Periportal localization of glucagon receptor mRNA in rat liver and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocyte cultures. *FEBS Lett* 421: 136-140.
79. Hazel, S. J., Nordqvist, A. C., Hall, K., Nilsson, M., and Schalling, M. (1998). Differential expression of IGF-I and IGF-binding protein-1 and -2 in periportal and perivenous zones of rat liver. *J Endocrinol* 157: 285-294.
80. Katz, N. R. (1992). Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *The Journal of nutrition* 122: 843-849.
81. Sasse, D. (1975). Dynamics of liver glycogen: the topochemistry of glycogen synthesis, glycogen content and glycogenolysis under the experimental conditions of glycogen accumulation and depletion. *Histochemistry* 45: 237-254.
82. Jungermann, K., and Kietzmann, T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* 16: 179-203.
83. Tosh, D., and Agius, L. (1994). Glycogen degradation by adrenergic agonists and glucagon in periportal and perivenous rat hepatocyte cultures. *Biochimica et biophysica acta* 1221: 238-242.
84. Aggarwal, S. R., Lindros, K. O., and Palmer, T. N. (1995). Glucagon stimulates phosphorylation of different peptides in isolated periportal and perivenous hepatocytes. *FEBS Lett* 377: 439-443.
85. Zierz, S., Katz, N., and Jungermann, K. (1983). Distribution of pyruvate kinase type L and M2 in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue with different dietary states. *Hoppe-Seyley's Zeitschrift fur physiologische Chemie* 364: 1447-1453.
86. Eilers, F., Bartels, H., and Jungermann, K. (1993). Zonal expression of the glucokinase gene in rat liver. Dynamics during the daily feeding rhythm and starvation-refeeding cycle demonstrated by in situ hybridization. *Histochemistry* 99: 133-140.

87. Kietzmann, T., Roth, U., Freimann, S., and Jungermann, K. (1997). Arterial oxygen partial pressures reduce the insulin-dependent induction of the perivenously located glucokinase in rat hepatocyte cultures: mimicry of arterial oxygen pressures by H₂O₂. *Biochem J* 321 (Pt 1): 17-20.
88. Moorman, A. F., de Boer, P. A., Charles, R., and Lamers, W. H. (1991). Pericentral expression pattern of glucokinase mRNA in the rat liver lobulus. *FEBS Lett* 287: 47-52.
89. Wals, P. A., Palacin, M., and Katz, J. (1988). The zonation of liver and the distribution of fructose 2,6-bisphosphate in rat liver. *J Biol Chem* 263: 4876-4881.
90. Quistorff, B., Katz, N., and Witters, L. A. (1992). Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of fatty acids: discrepancies on zonation of acetyl-CoA carboxylase. *Enzyme* 46: 59-71.
91. Rieder, H. (1981). NADP-dependent dehydrogenases in rat liver parenchyma. III. The description of a liponeogenic area on the basis of histochemically demonstrated enzyme activities and the neutral fat content during fasting and refeeding. *Histochemistry* 72: 579-615.
92. Burns, S. P., et al. (1999). Zonation of gluconeogenesis, ketogenesis and intracellular pH in livers from normal and diabetic ketoacidotic rats: evidence for intralobular redistribution of metabolic events in ketoacidosis. *Biochem J* 343 Pt 1: 273-280.
93. Wimmer, M., Luttringer, C., and Colombi, M. (1990). Changes in the acinar activity patterns of phosphoenolpyruvate carboxykinase in livers of male and female rats upon feeding a high protein and a high fat diet. *Histochemistry* 93: 257-262.
94. Bizeau, M. E., Thresher, J. S., and Pagliassotti, M. J. (2001). A high-sucrose diet increases gluconeogenic capacity in isolated periportal and perivenous rat hepatocytes. *American journal of physiology* 280: E695-702.
95. Oinonen, T., and Lindros, K. O. (1998). Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochem J* 329 (Pt 1): 17-35.
96. Gupta, S., Rajvanshi, P., Sokhi, R. P., Vaidya, S., Irani, A. N., and Gorla, G. R. (1999). Position-specific gene expression in the liver lobule is directed by the microenvironment and not by the previous cell differentiation state. *J Biol Chem* 274: 2157-2165.
97. Hailfinger, S., Jaworski, M., Braeuning, A., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2006). Zonal gene expression in murine liver: lessons from tumors. *Hepatology (Baltimore, Md)* 43: 407-414.
98. Jungermann, K., and Kietzmann, T. (2000). Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology (Baltimore, Md)* 31: 255-260.
99. Jungermann, K., and Kietzmann, T. (1997). Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney international* 51: 402-412.
100. Gebhardt, R. (1992). Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacology & therapeutics* 53: 275-354.

101. Reid, L. M., Fiorino, A. S., Sigal, S. H., Brill, S., and Holst, P. A. (1992). Extracellular matrix gradients in the space of Disse: relevance to liver biology. *Hepatology (Baltimore, Md)* 15: 1198-1203.
102. Spear, B. T., Jin, L., Ramasamy, S., and Dobierzewska, A. (2006). Transcriptional control in the mammalian liver: liver development, perinatal repression, and zonal gene regulation. *Cell Mol Life Sci* 63: 2922-2938.
103. Bralet, M. P., Branchereau, S., Brechot, C., and Ferry, N. (1994). Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver. *The American journal of pathology* 144: 896-905.
104. Braeuning, A., Ittrich, C., Kohle, C., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2007). Zonal gene expression in mouse liver resembles expression patterns of Ha-ras and beta-catenin mutated hepatomas. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35: 503-507.
105. Cadoret, A., et al. (2002). New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene* 21: 8293-8301.
106. Sekine, S., Lan, B. Y., Bedolli, M., Feng, S., and Hebrok, M. (2006). Liver-specific loss of beta-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)* 43: 817-825.
107. Zeng, G., et al. (2007). Wnt'er in liver: expression of Wnt and frizzled genes in mouse. *Hepatology (Baltimore, Md)* 45: 195-204.
108. Gebhardt, R., Schuler, M., and Schorner, D. (1998). The spontaneous induction of glutamine synthetase in pig hepatocytes cocultured with RL-ET-14 cells is completely inhibited by trijodothyronine and okadaic acid. *Biochemical and biophysical research communications* 246: 895-898.
109. Schrode, W., Mecke, D., and Gebhardt, R. (1990). Induction of glutamine synthetase in periportal hepatocytes by cocultivation with a liver epithelial cell line. *European journal of cell biology* 53: 35-41.
110. Kuo, F. C., and Darnell, J. E., Jr. (1991). Evidence that interaction of hepatocytes with the collecting (hepatic) veins triggers position-specific transcription of the glutamine synthetase and ornithine aminotransferase genes in the mouse liver. *Mol Cell Biol* 11: 6050-6058.
111. Braeuning, A., and Schwarz, M. (2010). beta-Catenin as a multilayer modulator of zonal cytochrome P450 expression in mouse liver. *Biological chemistry* 391: 139-148.
112. Giera, S., et al. (2010). Wnt/beta-catenin signaling activates and determines hepatic zonal expression of glutathione S-transferases in mouse liver. *Toxicol Sci* 115: 22-33.
113. Braeuning, A., et al. (2007). Serum components and activated Ha-ras antagonize expression of perivenous marker genes stimulated by beta-catenin signaling in mouse hepatocytes. *Febs J* 274: 4766-4777.

114. Bederman, I. R., et al. (2004). Zonation of labeling of lipogenic acetyl-CoA across the liver: implications for studies of lipogenesis by mass isotopomer analysis. *J Biol Chem* 279: 43207-43216.
115. Yang, L., et al. (2008). Metabolomic and mass isotopomer analysis of liver gluconeogenesis and citric acid cycle: II. Heterogeneity of metabolite labeling pattern. *J Biol Chem* 283: 21988-21996.
116. Ferre, T., Pujol, A., Riu, E., Bosch, F., and Valera, A. (1996). Correction of diabetic alterations by glucokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7225-7230.
117. Ferre, T., Riu, E., Franckhauser, S., Agudo, J., and Bosch, F. (2003). Long-term overexpression of glucokinase in the liver of transgenic mice leads to insulin resistance. *Diabetologia* 46: 1662-1668.
118. Hariharan, N., et al. (1997). Expression of human hepatic glucokinase in transgenic mice liver results in decreased glucose levels and reduced body weight. *Diabetes* 46: 11-16.
119. She, P., Shiota, M., Shelton, K. D., Chalkley, R., Postic, C., and Magnuson, M. A. (2000). Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Mol Cell Biol* 20: 6508-6517.
120. Iynedjian, P. B. (2009). Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci* 66: 27-42.
121. Matschinsky, F. M. (2002). Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes* 51 Suppl 3: S394-S404.
122. Matschinsky, F. M., et al. (2006). The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes* 55: 1-12.
123. Meglasson, M. D., and Matschinsky, F. M. (1984). New perspectives on pancreatic islet glucokinase. *The American journal of physiology* 246: E1-13.
124. Bedoya, F. J., Matschinsky, F. M., Shimizu, T., O'Neil, J. J., and Appel, M. C. (1986). Differential regulation of glucokinase activity in pancreatic islets and liver of the rat. *J Biol Chem* 261: 10760-10764.
125. Shelton, K. D., Franklin, A. J., Khor, A., Beechem, J., and Magnuson, M. A. (1992). Multiple elements in the upstream glucokinase promoter contribute to transcription in insulinoma cells. *Mol Cell Biol* 12: 4578-4589.
126. Stoffel, M., et al. (1992). Human glucokinase gene: isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7698-7702.
127. Liang, Y., et al. (1995). Variable effects of maturity-onset-diabetes-of-youth (MODY)-associated glucokinase mutations on substrate interactions and stability of the enzyme. *Biochem J* 309 (Pt 1): 167-173.

128. Davis, E. A., et al. (1999). Mutants of glucokinase cause hypoglycaemia- and hyperglycaemia syndromes and their analysis illuminates fundamental quantitative concepts of glucose homeostasis. *Diabetologia* 42: 1175-1186.
129. Gidh-Jain, M., et al. (1993). Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1932-1936.
130. Tinto, N., et al. (2008). Glucokinase gene mutations: structural and genotype-phenotype analyses in MODY children from South Italy. *PLoS ONE* 3: e1870.
131. Postic, C., et al. (1999). Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J Biol Chem* 274: 305-315.
132. Niswender, K. D., Shiota, M., Postic, C., Cherrington, A. D., and Magnuson, M. A. (1997). Effects of increased glucokinase gene copy number on glucose homeostasis and hepatic glucose metabolism. *J Biol Chem* 272: 22570-22575.
133. Niswender, K. D., et al. (1997). Cell-specific expression and regulation of a glucokinase gene locus transgene. *J Biol Chem* 272: 22564-22569.
134. Ferre, T., Riu, E., Bosch, F., and Valera, A. (1996). Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *Faseb J* 10: 1213-1218.
135. Grupe, A., Hultgren, B., Ryan, A., Ma, Y. H., Bauer, M., and Stewart, T. A. (1995). Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell* 83: 69-78.
136. Kamata, K., Mitsuya, M., Nishimura, T., Eiki, J., and Nagata, Y. (2004). Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* 12: 429-438.
137. Grimsby, J., et al. (2003). Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. *Science* 301: 370-373.
138. Wilson, J. E. (1995). Hexokinases. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 126: 65-198.
139. Zelent, B., et al. (2008). Sugar binding to recombinant wild-type and mutant glucokinase monitored by kinetic measurement and tryptophan fluorescence. *Biochem J*.
140. Zhang, J., Li, C., Chen, K., Zhu, W., Shen, X., and Jiang, H. (2006). Conformational transition pathway in the allosteric process of human glucokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13368-13373.
141. Postic, C., et al. (1995). Cloning and characterization of the mouse glucokinase gene locus and identification of distal liver-specific DNase I hypersensitive sites. *Genomics* 29: 740-750.

142. Sorenson, R. L., Stout, L. E., Brelje, T. C., Jetton, T. L., and Matschinsky, F. M. (2007). Immunohistochemical evidence for the presence of glucokinase in the gonadotropes and thyrotropes of the anterior pituitary gland of rat and monkey. *J Histochem Cytochem* 55: 555-566.
143. Zelent, D., et al. (2006). A glucose sensor role for glucokinase in anterior pituitary cells. *Diabetes* 55: 1923-1929.
144. Matschinsky, F. M. (2009). Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nature reviews* 8: 399-416.
145. Ilyedjian, P. B., et al. (1989). Differential expression and regulation of the glucokinase gene in liver and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7838-7842.
146. Ilyedjian, P. B., Jotterand, D., Nospikel, T., Asfari, M., and Pilot, P. R. (1989). Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J Biol Chem* 264: 21824-21829.
147. Magnuson, M. A., Andreone, T. L., Printz, R. L., Koch, S., and Granner, D. K. (1989). Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 4838-4842.
148. Christ, B., Probst, I., and Jungermann, K. (1986). Antagonistic regulation of the glucose/glucose 6-phosphate cycle by insulin and glucagon in cultured hepatocytes. *Biochem J* 238: 185-191.
149. Ilyedjian, P. B., Roth, R. A., Fleischmann, M., and Gjinovci, A. (2000). Activation of protein kinase B/cAkt in hepatocytes is sufficient for the induction of expression of the gene encoding glucokinase. *Biochem J* 351 Pt 3: 621-627.
150. Matsumoto, M., et al. (2002). Role of the insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in insulin-induced expression of sterol regulatory element binding protein 1c and glucokinase genes in rat hepatocytes. *Diabetes* 51: 1672-1680.
151. Ribaux, P. G., and Ilyedjian, P. B. (2003). Analysis of the role of protein kinase B (cAKT) in insulin-dependent induction of glucokinase and sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) mRNAs in hepatocytes. *Biochem J* 376: 697-705.
152. Stoeckman, A. K., and Towle, H. C. (2002). The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *J Biol Chem* 277: 27029-27035.
153. Becard, D., Hainault, I., Azzout-Marniche, D., Bertry-Coussot, L., Ferre, P., and Foufelle, F. (2001). Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice. *Diabetes* 50: 2425-2430.
154. Ono, H., et al. (2003). Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly, and hypertriglyceridemia with sterol regulatory element binding protein involvement. *Diabetes* 52: 2905-2913.

155. Kim, S. Y., et al. (2004). SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression. *J Biol Chem* 279: 30823-30829.
156. Hansmann, F., Mordier, S., and Iynedjian, P. B. (2006). Insulin induction of glucokinase and fatty acid synthase in hepatocytes: analysis of the roles of sterol-regulatory-element-binding protein-1c and liver X receptor. *Biochem J* 399: 275-283.
157. Gregori, C., Guillet-Deniau, I., Girard, J., Decaux, J. F., and Pichard, A. L. (2006). Insulin regulation of glucokinase gene expression: evidence against a role for sterol regulatory element binding protein 1 in primary hepatocytes. *FEBS Lett* 580: 410-414.
158. Denechaud, P. D., et al. (2008). ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest* 118: 956-964.
159. Roth, U., Curth, K., Unterman, T. G., and Kietzmann, T. (2004). The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 279: 2623-2631.
160. Roth, U., Jungermann, K., and Kietzmann, T. (2002). Activation of glucokinase gene expression by hepatic nuclear factor 4alpha in primary hepatocytes. *Biochem J* 365: 223-228.
161. Chen, G., Zhang, Y., Lu, D., Li, N. Q., and Ross, A. C. (2009). Retinoids synergize with insulin to induce hepatic Gck expression. *Biochem J* 419: 645-653.
162. Zhu, L. L., et al. (2010). PGC-1alpha coactivates estrogen-related receptor-alpha to induce the expression of glucokinase. *American journal of physiology* 298: E1210-1218.
163. Decaux, J. F., Juanes, M., Bossard, P., and Girard, J. (1997). Effects of triiodothyronine and retinoic acid on glucokinase gene expression in neonatal rat hepatocytes. *Molecular and cellular endocrinology* 130: 61-67.
164. Narkewicz, M. R., Iynedjian, P. B., Ferre, P., and Girard, J. (1990). Insulin and triiodothyronine induce glucokinase mRNA in primary cultures of neonatal rat hepatocytes. *Biochem J* 271: 585-589.
165. Lannoy, V. J., Decaux, J. F., Pierreux, C. E., Lemaigre, F. P., and Rousseau, G. G. (2002). Liver glucokinase gene expression is controlled by the oncut transcription factor hepatocyte nuclear factor-6. *Diabetologia* 45: 1136-1141.
166. Rausa, F. M., et al. (2000). Elevated levels of hepatocyte nuclear factor 3beta in mouse hepatocytes influence expression of genes involved in bile acid and glucose homeostasis. *Mol Cell Biol* 20: 8264-8282.
167. Kim, S. Y., et al. (2004). Liver glucokinase can be activated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 53 Suppl 1: S66-70.
168. Zelent, D., et al. (2005). Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas. *Biochem Soc Trans* 33: 306-310.

169. Ekman, P., and Nilsson, E. (1988). Phosphorylation of glucokinase from rat liver in vitro by protein kinase A with a concomitant decrease of its activity. *Archives of biochemistry and biophysics* 261: 275-282.
170. Munoz-Alonso, M. J., Guillemain, G., Kassis, N., Girard, J., Burnol, A. F., and Leturque, A. (2000). A novel cytosolic dual specificity phosphatase, interacting with glucokinase, increases glucose phosphorylation rate. *J Biol Chem* 275: 32406-32412.
171. Tiedge, M., Krug, U., and Lenzen, S. (1997). Modulation of human glucokinase intrinsic activity by SH reagents mirrors post-translational regulation of enzyme activity. *Biochimica et biophysica acta* 1337: 175-190.
172. Tiedge, M., Richter, T., and Lenzen, S. (2000). Importance of cysteine residues for the stability and catalytic activity of human pancreatic beta cell glucokinase. *Archives of biochemistry and biophysics* 375: 251-260.
173. Tippett, P. S., and Neet, K. E. (1983). Interconversions between different sulfhydryl-related kinetic states in glucokinase. *Archives of biochemistry and biophysics* 222: 285-298.
174. Ding, S. Y., Tribble, N. D., Kraft, C. A., Markwardt, M., Gloyn, A. L., and Rizzo, M. A. (2010). Naturally occurring glucokinase mutations are associated with defects in posttranslational S-nitrosylation. *Mol Endocrinol* 24: 171-177.
175. Rizzo, M. A., and Piston, D. W. (2003). Regulation of beta cell glucokinase by S-nitrosylation and association with nitric oxide synthase. *The Journal of cell biology* 161: 243-248.
176. Van Schaftingen, E. (1989). A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. *Eur J Biochem* 179: 179-184.
177. Bontemps, F., Hue, L., and Hers, H. G. (1978). Phosphorylation of glucose in isolated rat hepatocytes. Sigmoidal kinetics explained by the activity of glucokinase alone. *Biochem J* 174: 603-611.
178. Clark, D. G., Filsell, O. H., and Topping, D. L. (1979). Effects of fructose concentration on carbohydrate metabolism, heat production and substrate cycling in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 184: 501-507.
179. Vandercammen, A., and Van Schaftingen, E. (1990). The mechanism by which rat liver glucokinase is inhibited by the regulatory protein. *Eur J Biochem* 191: 483-489.
180. Brocklehurst, K. J., et al. (2004). Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators. *Diabetes* 53: 535-541.
181. Mookhtiar, K. A., Kalinowski, S. S., Brown, K. S., Tsay, Y. H., Smith-Monroy, C., and Robinson, G. W. (1996). Heterologous expression and characterization of rat liver glucokinase regulatory protein. *Diabetes* 45: 1670-1677.
182. Baltrusch, S., Lenzen, S., Okar, D. A., Lange, A. J., and Tiedge, M. (2001). Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library.

Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner. *J Biol Chem* 276: 43915-43923.

183. Detheux, M., Vandercammen, A., and Van Schaftingen, E. (1991). Effectors of the regulatory protein acting on liver glucokinase: a kinetic investigation. *Eur J Biochem* 200: 553-561.

184. Vandercammen, A., and Van Schaftingen, E. (1991). Competitive inhibition of liver glucokinase by its regulatory protein. *Eur J Biochem* 200: 545-551.

185. Niculescu, L., Veiga-da-Cunha, M., and Van Schaftingen, E. (1997). Investigation on the mechanism by which fructose, hexitols and other compounds regulate the translocation of glucokinase in rat hepatocytes. *Biochem J* 321 (Pt 1): 239-246.

186. Farrelly, D., et al. (1999). Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: a sequestration mechanism in metabolic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14511-14516.

187. Grimsby, J., et al. (2000). Characterization of glucokinase regulatory protein-deficient mice. *J Biol Chem* 275: 7826-7831.

188. Shiota, C., Coffey, J., Grimsby, J., Grippo, J. F., and Magnuson, M. A. (1999). Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J Biol Chem* 274: 37125-37130.

189. de la Iglesia, N., Veiga-da-Cunha, M., Van Schaftingen, E., Guinovart, J. J., and Ferrer, J. C. (1999). Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. *FEBS Lett* 456: 332-338.

190. Bosco, D., Meda, P., and Iynedjian, P. B. (2000). Glucokinase and glucokinase regulatory protein: mutual dependence for nuclear localization. *Biochem J* 348 Pt 1: 215-222.

191. Chu, C. A., et al. (2004). Rapid translocation of hepatic glucokinase in response to intraduodenal glucose infusion and changes in plasma glucose and insulin in conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: 627-634.

192. Fernandez-Novell, J. M., Castel, S., Bellido, D., Ferrer, J. C., Vilario, S., and Guinovart, J. J. (1999). Intracellular distribution of hepatic glucokinase and glucokinase regulatory protein during the fasted to refeed transition in rats. *FEBS Lett* 459: 211-214.

193. Brown, K. S., Kalinowski, S. S., Megill, J. R., Durham, S. K., and Mookhtiar, K. A. (1997). Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus. *Diabetes* 46: 179-186.

194. Jetton, T. L., Shiota, M., Knobel, S. M., Piston, D. W., Cherrington, A. D., and Magnuson, M. A. (2001). Substrate-induced nuclear export and peripheral compartmentalization of hepatic glucokinase correlates with glycogen deposition. *Int J Exp Diabetes Res* 2: 173-186.

195. Mukhtar, M., Stubbs, M., and Agius, L. (1999). Evidence for glucose and sorbitol-induced nuclear export of glucokinase regulatory protein in hepatocytes. *FEBS Lett* 462: 453-458.

196. Toyoda, Y., Miwa, I., Satake, S., Anai, M., and Oka, Y. (1995). Nuclear location of the regulatory protein of glucokinase in rat liver and translocation of the regulator to the cytoplasm in response to high glucose. *Biochemical and biophysical research communications* 215: 467-473.
197. Agius, L. (1994). Control of glucokinase translocation in rat hepatocytes by sorbitol and the cytosolic redox state. *Biochem J* 298 (Pt 1): 237-243.
198. Agius, L., and Peak, M. (1993). Intracellular binding of glucokinase in hepatocytes and translocation by glucose, fructose and insulin. *Biochem J* 296 (Pt 3): 785-796.
199. Agius, L., and Stubbs, M. (2000). Investigation of the mechanism by which glucose analogues cause translocation of glucokinase in hepatocytes: evidence for two glucose binding sites. *Biochem J* 346 Pt 2: 413-421.
200. Futamura, M., et al. (2006). An allosteric activator of glucokinase impairs the interaction of glucokinase and glucokinase regulatory protein and regulates glucose metabolism. *J Biol Chem* 281: 37668-37674.
201. Mukhtar, M. H., et al. (2008). Inhibition of glucokinase translocation by AMP-activated protein kinase is associated with phosphorylation of both GKRP and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R766-774.
202. Agius, L. (1997). Involvement of glucokinase translocation in the mechanism by which resorcinol inhibits glycolysis in hepatocytes. *Biochem J* 325 (Pt 3): 667-673.
203. Payne, V. A., Arden, C., Lange, A. J., and Agius, L. (2007). Contributions of glucokinase and phosphofructokinase-2/fructose bisphosphatase-2 to the elevated glycolysis in hepatocytes from Zucker fa/fa rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R618-625.
204. Guigas, B., et al. (2006). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes* 55: 865-874.
205. Vandercammen, A., and Van Schaftingen, E. (1993). Species and tissue distribution of the regulatory protein of glucokinase. *Biochem J* 294 (Pt 2): 551-556.
206. Van Schaftingen, E., Detheux, M., and Veiga da Cunha, M. (1994). Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *Faseb J* 8: 414-419.
207. Slosberg, E. D., et al. (2001). Treatment of type 2 diabetes by adenoviral-mediated overexpression of the glucokinase regulatory protein. *Diabetes* 50: 1813-1820.
208. de la Iglesia, N., Mukhtar, M., Seoane, J., Guinovart, J. J., and Agius, L. (2000). The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *J Biol Chem* 275: 10597-10603.
209. Fujimoto, Y., Donahue, E. P., and Shiota, M. (2004). Defect in glucokinase translocation in Zucker diabetic fatty rats. *American journal of physiology* 287: E414-423.

210. Orho-Melander, M., et al. (2008). Common missense variant in the glucokinase regulatory protein gene is associated with increased plasma triglyceride and C-reactive protein but lower fasting glucose concentrations. *Diabetes* 57: 3112-3121.
211. Sparso, T., et al. (2008). The GCKR rs780094 polymorphism is associated with elevated fasting serum triacylglycerol, reduced fasting and OGTT-related insulinaemia, and reduced risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* 51: 70-75.
212. Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J. A., Vazquez, P., and Blazquez, E. (2002). Evidence that glucokinase regulatory protein is expressed and interacts with glucokinase in rat brain. *Journal of neurochemistry* 80: 45-53.
213. Roncero, I., Sanz, C., Alvarez, E., Vazquez, P., Barrio, P. A., and Blazquez, E. (2009). Glucokinase and glucokinase regulatory proteins are functionally coexpressed before birth in the rat brain. *Journal of neuroendocrinology* 21: 973-981.
214. Baltrusch, S., Langer, S., Massa, L., Tiedge, M., and Lenzen, S. (2006). Improved metabolic stimulus for glucose-induced insulin secretion through GK and PFK-2/FBPase-2 coexpression in insulin-producing RINm5F cells. *Endocrinology* 147: 5768-5776.
215. Massa, L., Baltrusch, S., Okar, D. A., Lange, A. J., Lenzen, S., and Tiedge, M. (2004). Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells. *Diabetes* 53: 1020-1029.
216. Smith, W. E., Langer, S., Wu, C., Baltrusch, S., and Okar, D. A. (2007). Molecular coordination of hepatic glucose metabolism by the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase:glucokinase complex. *Mol Endocrinol* 21: 1478-1487.
217. Danial, N. N., et al. (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424: 952-956.
218. Danial, N. N., et al. (2008). Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat Med*.
219. Downward, J. (2003). Cell biology: metabolism meets death. *Nature* 424: 896-897.
220. Bjorkhaug, L., Molnes, J., Sovik, O., Njolstad, P. R., and Flatmark, T. (2007). Allosteric activation of human glucokinase by free polyubiquitin chains and its ubiquitin-dependent cotranslational proteasomal degradation. *J Biol Chem* 282: 22757-22764.
221. Shiraishi, A., et al. (2001). A novel glucokinase regulator in pancreatic beta cells: precursor of propionyl-CoA carboxylase beta subunit interacts with glucokinase and augments its activity. *J Biol Chem* 276: 2325-2328.
222. Hue, L., Maisin, L., and Rider, M. H. (1988). Palmitate inhibits liver glycolysis. Involvement of fructose 2,6-bisphosphate in the glucose/fatty acid cycle. *Biochem J* 251: 541-545.

223. Kim, Y. B., Kalinowski, S. S., and Marcinkeviciene, J. (2007). A pre-steady state analysis of ligand binding to human glucokinase: evidence for a preexisting equilibrium. *Biochemistry* 46: 1423-1431.
224. Tippett, P. S., and Neet, K. E. (1982). Specific inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzymes A below the critical micelle concentration. *J Biol Chem* 257: 12839-12845.
225. Wals, P. A., and Katz, J. (1994). Glucose-glucose 6-phosphate cycling in hepatocytes determined by incorporation of 3HOH and D2O. Effect of glycosyls and fructose. *J Biol Chem* 269: 18343-18352.
226. Maechler, P., and Wollheim, C. B. (2001). Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* 414: 807-812.
227. Gromada, J., Franklin, I., and Wollheim, C. B. (2007). Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocrine reviews* 28: 84-116.
228. Pagliara, A. S., Stillings, S. N., Hover, B., Martin, D. M., and Matschinsky, F. M. (1974). Glucose modulation of amino acid-induced glucagon and insulin release in the isolated perfused rat pancreas. *J Clin Invest* 54: 819-832.
229. Vieira, E., Salehi, A., and Gylfe, E. (2007). Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia* 50: 370-379.
230. Reimann, F., Habib, A. M., Tolhurst, G., Parker, H. E., Rogers, G. J., and Gribble, F. M. (2008). Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab* 8: 532-539.
231. Murphy, R., Tura, A., Clark, P. M., Holst, J. J., Mari, A., and Hattersley, A. T. (2009). Glucokinase, the pancreatic glucose sensor, is not the gut glucose sensor. *Diabetologia* 52: 154-159.
232. Roncero, I., Alvarez, E., Vazquez, P., and Blazquez, E. (2000). Functional glucokinase isoforms are expressed in rat brain. *Journal of neurochemistry* 74: 1848-1857.
233. Yang, X. J., Kow, L. M., Funabashi, T., and Mobbs, C. V. (1999). Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* 48: 1763-1772.
234. Lynch, R. M., Tompkins, L. S., Brooks, H. L., Dunn-Meynell, A. A., and Levin, B. E. (2000). Localization of glucokinase gene expression in the rat brain. *Diabetes* 49: 693-700.
235. Dunn-Meynell, A. A., Routh, V. H., Kang, L., Gaspers, L., and Levin, B. E. (2002). Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes* 51: 2056-2065.
236. Kang, L., et al. (2006). Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing. *Diabetes* 55: 412-420.
237. Kang, L., Routh, V. H., Kuzhikandathil, E. V., Gaspers, L. D., and Levin, B. E. (2004). Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* 53: 549-559.

238. Parton, L. E., et al. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449: 228-232.
239. Navarro, M., et al. (1996). Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *Journal of neurochemistry* 67: 1982-1991.
240. Wolfgang, M. J., and Lane, M. D. (2006). The role of hypothalamic malonyl-CoA in energy homeostasis. *J Biol Chem* 281: 37265-37269.
241. Cherrington, A. D. (1999). Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* 48: 1198-1214.
242. Donovan, C. M., Hamilton-Wessler, M., Halter, J. B., and Bergman, R. N. (1994). Primacy of liver glucosensors in the sympathetic response to progressive hypoglycemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2863-2867.
243. Froguel, P., et al. (1992). Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 356: 162-164.
244. Hattersley, A. T., et al. (1992). Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* 339: 1307-1310.
245. Cuesta-Munoz, A. L., et al. (2004). Severe persistent hyperinsulinemic hypoglycemia due to a de novo glucokinase mutation. *Diabetes* 53: 2164-2168.
246. Glaser, B., et al. (1998). Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *The New England journal of medicine* 338: 226-230.
247. Christesen, H. B., et al. (2002). The second activating glucokinase mutation (A456V): implications for glucose homeostasis and diabetes therapy. *Diabetes* 51: 1240-1246.
248. Gloyn, A. L., et al. (2003). Insights into the biochemical and genetic basis of glucokinase activation from naturally occurring hypoglycemia mutations. *Diabetes* 52: 2433-2440.
249. Njolstad, P. R., et al. (2003). Permanent neonatal diabetes caused by glucokinase deficiency: inborn error of the glucose-insulin signaling pathway. *Diabetes* 52: 2854-2860.
250. Njolstad, P. R., et al. (2001). Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *The New England journal of medicine* 344: 1588-1592.
251. Garcia-Herrero, C. M., et al. (2007). Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity. *Diabetologia* 50: 325-333.
252. Mahalingam, B., Cuesta-Munoz, A., Davis, E. A., Matschinsky, F. M., Harrison, R. W., and Weber, I. T. (1999). Structural model of human glucokinase in complex with glucose and ATP: implications for the mutants that cause hypo- and hyperglycemia. *Diabetes* 48: 1698-1705.

253. Miller, S. P., Anand, G. R., Karschnia, E. J., Bell, G. I., LaPorte, D. C., and Lange, A. J. (1999). Characterization of glucokinase mutations associated with maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2): different glucokinase defects lead to a common phenotype. *Diabetes* 48: 1645-1651.
254. Gloyn, A. L. (2003). Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Human mutation* 22: 353-362.
255. Galan, M., et al. (2006). Effects of novel maturity-onset diabetes of the young (MODY)-associated mutations on glucokinase activity and protein stability. *Biochem J* 393: 389-396.
256. Velho, G., et al. (1997). Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. *Diabetologia* 40: 217-224.
257. Velho, G., et al. (1996). Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J Clin Invest* 98: 1755-1761.
258. Velho, G., and Robert, J. J. (2002). Maturity-onset diabetes of the young (MODY): genetic and clinical characteristics. *Hormone research* 57 Suppl 1: 29-33.
259. Fajans, S. S., Bell, G. I., and Polonsky, K. S. (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *The New England journal of medicine* 345: 971-980.
260. Tappy, L., et al. (1997). Abnormal regulation of hepatic glucose output in maturity-onset diabetes of the young caused by a specific mutation of the glucokinase gene. *Diabetes* 46: 204-208.
261. Byrne, M. M., et al. (1994). Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycemia due to glucokinase mutations. *J Clin Invest* 93: 1120-1130.
262. Heredia, V. V., Carlson, T. J., Garcia, E., and Sun, S. (2006). Biochemical basis of glucokinase activation and the regulation by glucokinase regulatory protein in naturally occurring mutations. *J Biol Chem* 281: 40201-40207.
263. Pedelini, L., et al. (2005). Structure-function analysis of the alpha5 and the alpha13 helices of human glucokinase: description of two novel activating mutations. *Protein Sci* 14: 2080-2086.
264. Heredia, V. V., Thomson, J., Nettleton, D., and Sun, S. (2006). Glucose-induced conformational changes in glucokinase mediate allosteric regulation: transient kinetic analysis. *Biochemistry* 45: 7553-7562.
265. Bali, D., et al. (1995). Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of the mouse glucokinase gene. *J Biol Chem* 270: 21464-21467.
266. Postic, C., and Magnuson, M. A. (1999). [Role of glucokinase (GK) in the maintenance of glucose homeostasis. Specific disruption of the gene by the Cre-loxP technique]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*: 115-124.

267. Terauchi, Y., et al. (1995). Pancreatic beta-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *J Biol Chem* 270: 30253-30256.
268. Niswender, K. D., Postic, C., Shiota, M., Jetton, T. L., and Magnuson, M. A. (1997). Effects of altered glucokinase gene copy number on blood glucose homeostasis. *Biochem Soc Trans* 25: 113-117.
269. Shiota, M., et al. (2001). Glucokinase gene locus transgenic mice are resistant to the development of obesity-induced type 2 diabetes. *Diabetes* 50: 622-629.
270. O'Doherty, R. M., Lehman, D. L., Telemaque-Potts, S., and Newgard, C. B. (1999). Metabolic impact of glucokinase overexpression in liver: lowering of blood glucose in fed rats is accompanied by hyperlipidemia. *Diabetes* 48: 2022-2027.
271. Scott, D. K., et al. (2003). A modest glucokinase overexpression in the liver promotes fed expression levels of glycolytic and lipogenic enzyme genes in the fasted state without altering SREBP-1c expression. *Mol Cell Biochem* 254: 327-337.
272. Desai, U. J., et al. (2001). Phenotypic correction of diabetic mice by adenovirus-mediated glucokinase expression. *Diabetes* 50: 2287-2295.
273. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care* 27: 1047-1053.
274. Zimmet, P., Alberti, K. G., and Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787.
275. Haverkos, H. W. (1997). Could the aetiology of IDDM be multifactorial? *Diabetologia* 40: 1235-1240.
276. Todd, J. A., and Farrall, M. (1996). Panning for gold: genome-wide scanning for linkage in type 1 diabetes. *Human molecular genetics* 5 Spec No: 1443-1448.
277. Thomas, H. E., and Kay, T. W. (2000). Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes/metabolism research and reviews* 16: 251-261.
278. Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-867.
279. Haffner, S. M., Stern, M. P., Mitchell, B. D., Hazuda, H. P., and Patterson, J. K. (1990). Incidence of type II diabetes in Mexican Americans predicted by fasting insulin and glucose levels, obesity, and body-fat distribution. *Diabetes* 39: 283-288.
280. Lillioja, S., et al. (1993). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *The New England journal of medicine* 329: 1988-1992.
281. Warram, J. H., Martin, B. C., Krolewski, A. S., Soeldner, J. S., and Kahn, C. R. (1990). Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Annals of internal medicine* 113: 909-915.

282. Buchanan, T. A., et al. (2002). Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes* 51: 2796-2803.
283. Gerstein, H. C., et al. (2006). Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet* 368: 1096-1105.
284. Kahn, B. B. (1998). Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* 92: 593-596.
285. DeFronzo, R. A. (1999). Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Annals of internal medicine* 131: 281-303.
286. Boden, G. (2001). Pathogenesis of type 2 diabetes. Insulin resistance. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 30: 801-815, v.
287. Saltiel, A. R., and Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
288. Shafir, E., and Raz, I. (2003). Diabetes: mellitus or lipodus? *Diabetologia* 46: 433-440.
289. Lewis, G. F., Carpentier, A., Adeli, K., and Giacca, A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine reviews* 23: 201-229.
290. Savage, D. B., Petersen, K. F., and Shulman, G. I. (2007). Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiological reviews* 87: 507-520.
291. Stumvoll, M., Goldstein, B. J., and van Haefen, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365: 1333-1346.
292. Abel, E. D., et al. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409: 729-733.
293. Bruning, J. C., et al. (1998). A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Molecular cell* 2: 559-569.
294. Lauro, D., et al. (1998). Impaired glucose tolerance in mice with a targeted impairment of insulin action in muscle and adipose tissue. *Nature genetics* 20: 294-298.
295. Kim, J. K., et al. (2000). Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest* 105: 1791-1797.
296. Michael, M. D., et al. (2000). Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Molecular cell* 6: 87-97.
297. Collins, Q. F., Xiong, Y., Lupo, E. G., Jr., Liu, H. Y., and Cao, W. (2006). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates free fatty acid-induced gluconeogenesis in hepatocytes. *J Biol Chem* 281: 24336-24344.

298. Shapiro, A. M., and Lakey, J. R. (2000). Future trends in islet cell transplantation. *Diabetes technology & therapeutics* 2: 449-452.
299. Krentz, A. J., and Bailey, C. J. (2005). Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 65: 385-411.
300. Kahn, C. R., Chen, L., and Cohen, S. E. (2000). Unraveling the mechanism of action of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 106: 1305-1307.
301. Brunmair, B., et al. (2004). Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes* 53: 1052-1059.
302. Zou, M. H., et al. (2004). Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 279: 43940-43951.
303. Shaw, R. J., et al. (2005). The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310: 1642-1646.
304. Hundal, R. S., et al. (2000). Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 49: 2063-2069.
305. Kirpichnikov, D., McFarlane, S. I., and Sowers, J. R. (2002). Metformin: an update. *Annals of internal medicine* 137: 25-33.
306. Kay, M. A., Glorioso, J. C., and Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7: 33-40.
307. Bottino, R., Lemarchand, P., Trucco, M., and Giannoukakis, N. (2003). Gene- and cell-based therapeutics for type I diabetes mellitus. *Gene therapy* 10: 875-889.
308. Trucco, M. (2005). Regeneration of the pancreatic beta cell. *J Clin Invest* 115: 5-12.
309. Levine, F., and Leibowitz, G. (1999). Towards gene therapy of diabetes mellitus. *Molecular medicine today* 5: 165-171.
310. Lee, H. C., Kim, S. J., Kim, K. S., Shin, H. C., and Yoon, J. W. (2000). Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 408: 483-488.
311. Cheung, A. T., et al. (2000). Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science* 290: 1959-1962.
312. Ferber, S., et al. (2000). Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 6: 568-572.
313. Sasaki, K., et al. (2004). Gene therapy using replication-defective herpes simplex virus vectors expressing nerve growth factor in a rat model of diabetic cystopathy. *Diabetes* 53: 2723-2730.

314. Agius, L. (2007). New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best practice & research* 21: 587-605.
315. Morral, N. (2003). Novel targets and therapeutic strategies for type 2 diabetes. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 14: 169-175.
316. Riu, E., et al. (2002). Counteraction of type 1 diabetic alterations by engineering skeletal muscle to produce insulin: insights from transgenic mice. *Diabetes* 51: 704-711.
317. Jimenez-Chillaron, J. C., Newgard, C. B., and Gomez-Foix, A. M. (1999). Increased glucose disposal induced by adenovirus-mediated transfer of glucokinase to skeletal muscle in vivo. *Faseb J* 13: 2153-2160.
318. Jimenez-Chillaron, J. C., Telemaque-Potts, S., Gomez-Valades, A. G., Anderson, P., Newgard, C. B., and Gomez-Foix, A. M. (2002). Glucokinase gene transfer to skeletal muscle of diabetic Zucker fatty rats improves insulin-sensitive glucose uptake. *Metabolism* 51: 121-126.
319. Otaegui, P. J., Ferre, T., Pujol, A., Riu, E., Jimenez, R., and Bosch, F. (2000). Expression of glucokinase in skeletal muscle: a new approach to counteract diabetic hyperglycemia. *Hum Gene Ther* 11: 1543-1552.
320. Otaegui, P. J., Ferre, T., Riu, E., and Bosch, F. (2003). Prevention of obesity and insulin resistance by glucokinase expression in skeletal muscle of transgenic mice. *Faseb J* 17: 2097-2099.
321. Mas, A., et al. (2006). Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle. *Diabetes* 55: 1546-1553.
322. Parsons, G. B., et al. (2007). Ectopic expression of glucagon-like peptide 1 for gene therapy of type II diabetes. *Gene therapy* 14: 38-48.
323. Lee, Y. S., et al. (2007). Glucagon-like peptide-1 gene therapy in obese diabetic mice results in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic gluconeogenesis. *Diabetes* 56: 1671-1679.
324. Nakae, J., et al. (2002). Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nature genetics* 32: 245-253.
325. Qu, S., et al. (2006). Aberrant Forkhead box O1 function is associated with impaired hepatic metabolism. *Endocrinology* 147: 5641-5652.
326. Altomonte, J., et al. (2003). Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. *American journal of physiology* 285: E718-728.
327. Samuel, V. T., et al. (2006). Targeting foxo1 in mice using antisense oligonucleotide improves hepatic and peripheral insulin action. *Diabetes* 55: 2042-2050.
328. Kennedy, B. P., and Ramachandran, C. (2000). Protein tyrosine phosphatase-1B in diabetes. *Biochemical pharmacology* 60: 877-883.

329. Rondinone, C. M., et al. (2002). Protein tyrosine phosphatase 1B reduction regulates adiposity and expression of genes involved in lipogenesis. *Diabetes* 51: 2405-2411.
330. Gum, R. J., et al. (2003). Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice. *Diabetes* 52: 21-28.
331. Zinker, B. A., et al. (2002). PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11357-11362.
332. Liu, G. (2004). Technology evaluation: ISIS-113715, Isis. *Current opinion in molecular therapeutics* 6: 331-336.
333. Savage, D. B., et al. (2006). Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest* 116: 817-824.
334. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
335. Hammond, S. M., Caudy, A. A., and Hannon, G. J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2: 110-119.
336. Soutschek, J., et al. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178.
337. Zimmermann, T. S., et al. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441: 111-114.
338. Kobayashi, N., et al. (2004). Vector-based in vivo RNA interference: dose- and time-dependent suppression of transgene expression. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 308: 688-693.
339. Liu, F., Song, Y., and Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene therapy* 6: 1258-1266.
340. Lewis, D. L., and Wolff, J. A. (2005). Delivery of siRNA and siRNA expression constructs to adult mammals by hydrodynamic intravascular injection. *Methods in enzymology* 392: 336-350.
341. Song, E., et al. (2003). RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9: 347-351.
342. McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J., and Kay, M. A. (2002). RNA interference in adult mice. *Nature* 418: 38-39.
343. Rhee, J., et al. (2003). Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4012-4017.

344. Yoon, J. C., et al. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413: 131-138.
345. Gomez-Valades, A. G., et al. (2006). Overcoming diabetes-induced hyperglycemia through inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) with RNAi. *Mol Ther* 13: 401-410.
346. Gomez-Valades, A. G., et al. (2008). Pck1 gene silencing in the liver improves glycemia control, insulin sensitivity, and dyslipidemia in db/db mice. *Diabetes* 57: 2199-2210.
347. Agius, L. (2009). Targeting hepatic glucokinase in type 2 diabetes: weighing the benefits and risks. *Diabetes* 58: 18-20.
348. Caro, J. F., Triester, S., Patel, V. K., Tapscott, E. B., Frazier, N. L., and Dohm, G. L. (1995). Liver glucokinase: decreased activity in patients with type II diabetes. *Horm Metab Res* 27: 19-22.
349. Torres, T. P., et al. (2009). Restoration of hepatic glucokinase expression corrects hepatic glucose flux and normalizes plasma glucose in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 58: 78-86.
350. Bedoya, F. J., Oberholtzer, J. C., and Matschinsky, F. M. (1987). Glucokinase in B-cell-depleted islets of Langerhans. *J Histochem Cytochem* 35: 1089-1093.
351. Deng, S., et al. (2004). Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 53: 624-632.
352. Liang, Y., et al. (1994). In situ glucose uptake and glucokinase activity of pancreatic islets in diabetic and obese rodents. *J Clin Invest* 93: 2473-2481.
353. Shin, J. S., Torres, T. P., Catlin, R. L., Donahue, E. P., and Shiota, M. (2007). A defect in glucose-induced dissociation of glucokinase from the regulatory protein in Zucker diabetic fatty rats in the early stage of diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1381-1390.
354. Morral, N., Edenberg, H. J., Witting, S. R., Altomonte, J., Chu, T., and Brown, M. (2007). Effects of glucose metabolism on the regulation of genes of fatty acid synthesis and triglyceride secretion in the liver. *J Lipid Res* 48: 1499-1510.
355. Morral, N., et al. (2002). Adenovirus-mediated expression of glucokinase in the liver as an adjuvant treatment for type 1 diabetes. *Hum Gene Ther* 13: 1561-1570.
356. Wu, C., et al. (2005). Enhancing hepatic glycolysis reduces obesity: differential effects on lipogenesis depend on site of glycolytic modulation. *Cell Metab* 2: 131-140.
357. Efanov, A. M., et al. (2005). A novel glucokinase activator modulates pancreatic islet and hepatocyte function. *Endocrinology* 146: 3696-3701.
358. Fyfe, M. C., et al. (2007). Glucokinase activator PSN-GK1 displays enhanced antihyperglycaemic and insulinotropic actions. *Diabetologia* 50: 1277-1287.

359. Ralph, E. C., Thomson, J., Almaden, J., and Sun, S. (2008). Glucose Modulation of Glucokinase Activation by Small Molecules. *Biochemistry*.
360. Johnson, D., Shepherd, R. M., Gill, D., Gorman, T., Smith, D. M., and Dunne, M. J. (2007). Glucokinase activators: molecular tools for studying the physiology of insulin-secreting cells. *Biochem Soc Trans* 35: 1208-1210.
361. Coghlan, M., and Leighton, B. (2008). Glucokinase activators in diabetes management. *Expert Opin Investig Drugs* 17: 145-167.
362. Sarabu, R., and Grimsby, J. (2005). Targeting glucokinase activation for the treatment of type 2 diabetes--a status review. *Curr Opin Drug Discov Devel* 8: 631-637.
363. Grimsby, J., Berthel, S. J., and Sarabu, R. (2008). Glucokinase activators for the potential treatment of type 2 diabetes. *Current topics in medicinal chemistry* 8: 1524-1532.
364. Coope, G. J., et al. (2006). Predictive blood glucose lowering efficacy by Glucokinase activators in high fat fed female Zucker rats. *British journal of pharmacology* 149: 328-335.
365. Aston-Mourney, K., Proietto, J., Morahan, G., and Andrikopoulos, S. (2008). Too much of a good thing: why it is bad to stimulate the beta cell to secrete insulin. *Diabetologia* 51: 540-545.
366. Budker, V., Zhang, G., Knechtle, S., and Wolff, J. A. (1996). Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene therapy* 3: 593-598.
367. Zhang, G., Budker, V., and Wolff, J. A. (1999). High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 10: 1735-1737.
368. Suda, T., Gao, X., Stolz, D. B., and Liu, D. (2007). Structural impact of hydrodynamic injection on mouse liver. *Gene therapy* 14: 129-137.
369. Crespo, A., et al. (2005). Hydrodynamic liver gene transfer mechanism involves transient sinusoidal blood stasis and massive hepatocyte endocytic vesicles. *Gene therapy* 12: 927-935.
370. Zhang, G., et al. (2004). Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene therapy* 11: 675-682.
371. Budker, V. G., Subbotin, V. M., Budker, T., Sebestyen, M. G., Zhang, G., and Wolff, J. A. (2006). Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. II. Morphological studies. *The journal of gene medicine* 8: 874-888.
372. Budker, V., Budker, T., Zhang, G., Subbotin, V., Loomis, A., and Wolff, J. A. (2000). Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *The journal of gene medicine* 2: 76-88.
373. Sebestyen, M. G., et al. (2006). Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. *The journal of gene medicine* 8: 852-873.

374. Kobayashi, N., Kuramoto, T., Yamaoka, K., Hashida, M., and Takakura, Y. (2001). Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 297: 853-860.
375. Kobayashi, N., Nishikawa, M., Hirata, K., and Takakura, Y. (2004). Hydrodynamics-based procedure involves transient hyperpermeability in the hepatic cellular membrane: implication of a nonspecific process in efficient intracellular gene delivery. *The journal of gene medicine* 6: 584-592.
376. Nishikawa, M., Nakayama, A., Takahashi, Y., Fukuhara, Y., and Takakura, Y. (2008). Reactivation of silenced transgene expression in mouse liver by rapid, large-volume injection of isotonic solution. *Hum Gene Ther* 19: 1009-1020.
377. Giladi, H., Ketzinel-Gilad, M., Rivkin, L., Felig, Y., Nussbaum, O., and Galun, E. (2003). Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther* 8: 769-776.
378. Condiotti, R., et al. (2004). Prolonged liver-specific transgene expression by a non-primate lentiviral vector. *Biochemical and biophysical research communications* 320: 998-1006.
379. Fujita, S., et al. (2006). Sendai virus-mediated gene delivery into hepatocytes via isolated hepatic perfusion. *Biological & pharmaceutical bulletin* 29: 1728-1734.
380. Suda, T., and Liu, D. (2007). Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications. *Mol Ther* 15: 2063-2069.
381. Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108: 193-199.
382. Bauer, S., et al. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9237-9242.
383. Hemmi, H., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745.
384. Klug, M., and Rehli, M. (2006). Functional analysis of promoter CpG methylation using a CpG-free luciferase reporter vector. *Epigenetics* 1: 127-130.
385. Yew, N. S., et al. (2000). Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Mol Ther* 1: 255-262.
386. Hodges, B. L., Taylor, K. M., Joseph, M. F., Bourgeois, S. A., and Scheule, R. K. (2004). Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides. *Mol Ther* 10: 269-278.
387. Hyde, S. C., et al. (2008). CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nature biotechnology* 26: 549-551.
388. Kawano, H., et al. (2007). Improved anti-cancer effect of interferon gene transfer by sustained expression using CpG-reduced plasmid DNA. *International journal of cancer* 121: 401-406.

389. Mitsui, M., et al. (2009). Effect of the content of unmethylated CpG dinucleotides in plasmid DNA on the sustainability of transgene expression. *The journal of gene medicine* 11: 435-443.
390. Yew, N. S., Przybylska, M., Ziegler, R. J., Liu, D., and Cheng, S. H. (2001). High and sustained transgene expression in vivo from plasmid vectors containing a hybrid ubiquitin promoter. *Mol Ther* 4: 75-82.
391. Shen, W., Scearce, L. M., Brestelli, J. E., Sund, N. J., and Kaestner, K. H. (2001). Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3gamma) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast. *J Biol Chem* 276: 42812-42817.
392. Cha, J. Y., and Repa, J. J. (2007). The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 282: 743-751.
393. Mitro, N., et al. (2007). The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445: 219-223.
394. Gavrilova, O., et al. (2003). Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 278: 34268-34276.
395. Jiang, J., Yamato, E., and Miyazaki, J. (2003). Long-term control of food intake and body weight by hydrodynamics-based delivery of plasmid DNA encoding leptin or CNTF. *The journal of gene medicine* 5: 977-983.
396. Jackerott, M., Baudry, A., Bucchini, D., Jami, J., and Joshi, R. L. (2002). Improved metabolic disorders of insulin receptor-deficient mice by transgenic overexpression of glucokinase in the liver. *Diabetologia* 45: 1292-1297.
397. Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R. E., Bashmakov, Y., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2000). Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Molecular cell* 6: 77-86.
398. Hanson, R. W., and Reshef, L. (2003). Glyceroneogenesis revisited. *Biochimie* 85: 1199-1205.
399. Reshef, L., Meyuhas, O., Boshwitz, C., Hanson, R. W., and Ballard, F. J. (1972). Physiological role and regulation of glyceroneogenesis in rat adipose tissue. *Israel journal of medical sciences* 8: 372-381.
400. Petersen, K. F., Laurent, D., Rothman, D. L., Cline, G. W., and Shulman, G. I. (1998). Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. *J Clin Invest* 101: 1203-1209.
401. Roden, M., et al. (1996). The roles of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glycogen synthesis and turnover in humans. *J Clin Invest* 97: 642-648.

402. Wu, C., Khan, S. A., Peng, L. J., and Lange, A. J. (2006). Roles for fructose-2,6-bisphosphate in the control of fuel metabolism: beyond its allosteric effects on glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Advances in enzyme regulation* 46: 72-88.
403. Kaestner, K. H., Hiemisch, H., and Schutz, G. (1998). Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol Cell Biol* 18: 4245-4251.
404. Puigserver, P., and Spiegelman, B. M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine reviews* 24: 78-90.
405. Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews* 74: 139-162.
406. Dypbukt, J. M., et al. (1994). Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J Biol Chem* 269: 30553-30560.
407. Takasu, N., Asawa, T., Komiya, I., Nagasawa, Y., and Yamada, T. (1991). Alloxan-induced DNA strand breaks in pancreatic islets. Evidence for H₂O₂ as an intermediate. *J Biol Chem* 266: 2112-2114.
408. Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., and Grodsky, G. M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52: 1-8.
409. Wu, L., et al. (2004). Oxidative stress is a mediator of glucose toxicity in insulin-secreting pancreatic islet cell lines. *J Biol Chem* 279: 12126-12134.
410. Paz, K., et al. (1997). A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272: 29911-29918.
411. Birnbaum, M. J. (2001). Turning down insulin signaling. *J Clin Invest* 108: 655-659.
412. Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 50: 537-546.
413. Dentin, R., et al. (2004). Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 279: 20314-20326.
414. Matsuzaka, T., et al. (2004). Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes* 53: 560-569.
415. Riu, E., Bosch, F., and Valera, A. (1996). Prevention of diabetic alterations in transgenic mice overexpressing Myc in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2198-2202.

416. Riu, E., Ferre, T., Mas, A., Hidalgo, A., Franckhauser, S., and Bosch, F. (2002). Overexpression of c-myc in diabetic mice restores altered expression of the transcription factor genes that regulate liver metabolism. *Biochem J* 368: 931-937.
417. Leighton, B., Atkinson, A., and Coghlan, M. P. (2005). Small molecule glucokinase activators as novel anti-diabetic agents. *Biochem Soc Trans* 33: 371-374.
418. Chen, C., et al. (2003). An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nature biotechnology* 21: 294-301.
419. Caperuto, L. C., et al. (2008). Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. *Endocrinology* 149: 6326-6335.
420. Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et biophysica acta* 1492: 203-206.
421. Kharitonov, A., et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 115: 1627-1635.
422. Xu, J., et al. (2009). Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58: 250-259.
423. Inagaki, T., et al. (2007). Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* 5: 415-425.
424. Dostalova, I., Haluzikova, D., and Haluzik, M. (2009). Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator with potential therapeutic properties in obesity/type 2 diabetes mellitus. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 58: 1-7.
425. Wheatcroft, S. B., et al. (2007). IGF-binding protein-2 protects against the development of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 285-294.
426. Yang, Q., et al. (2005). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436: 356-362.
427. Pino, M. F., et al. (2007). Glucokinase thermolability and hepatic regulatory protein binding are essential factors for predicting the blood glucose phenotype of missense mutations. *J Biol Chem* 282: 13906-13916.
428. Vaxillaire, M., et al. (2008). The common P446L polymorphism in GCKR inversely modulates fasting glucose and triglyceride levels and reduces type 2 diabetes risk in the DESIR prospective general French population. *Diabetes* 57: 2253-2257.
429. Shen, H., Pollin, T. I., Damcott, C. M., McLenithan, J. C., Mitchell, B. D., and Shuldiner, A. R. (2009). Glucokinase regulatory protein gene polymorphism affects postprandial lipemic response in a dietary intervention study. *Human genetics*.

430. Beer, N. L., et al. (2009). The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver. *Human molecular genetics*.
431. Piantadosi, C. A., and Suliman, H. B. (2008). Transcriptional Regulation of SDHa flavoprotein by nuclear respiratory factor-1 prevents pseudo-hypoxia in aerobic cardiac cells. *J Biol Chem* 283: 10967-10977.
432. Croce, M. A., Eagon, J. C., LaRiviere, L. L., Korenblat, K. M., Klein, S., and Finck, B. N. (2007). Hepatic lipin 1beta expression is diminished in insulin-resistant obese subjects and is reactivated by marked weight loss. *Diabetes* 56: 2395-2399.
433. Cimen, H., Han, M. J., Yang, Y., Tong, Q., Koc, H., and Koc, E. C. (2010). Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry* 49: 304-311.
434. Muller, F. L., et al. (2008). High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochem J* 409: 491-499.
435. Messam, C. A., Greene, J. G., Greenamyre, J. T., and Robinson, M. B. (1995). Intrastriatal injections of the succinate dehydrogenase inhibitor, malonate, cause a rise in extracellular amino acids that is blocked by MK-801. *Brain research* 684: 221-224.
436. Nordlie, R. C., and Foster, J. D. (2010). A retrospective review of the roles of multifunctional glucose-6-phosphatase in blood glucose homeostasis: Genesis of the tuning/retuning hypothesis. *Life sciences* 87: 339-349.
437. Okuno, A., et al. (1998). Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101: 1354-1361.
438. Slawik, M., and Vidal-Puig, A. J. (2007). Adipose tissue expandability and the metabolic syndrome. *Genes & nutrition* 2: 41-45.
439. Smith, J., Al-Amri, M., Dorairaj, P., and Sniderman, A. (2006). The adipocyte life cycle hypothesis. *Clin Sci (Lond)* 110: 1-9.
440. Wang, P., Renes, J., Bouwman, F., Bunschoten, A., Mariman, E., and Keijer, J. (2007). Absence of an adipogenic effect of rosiglitazone on mature 3T3-L1 adipocytes: increase of lipid catabolism and reduction of adipokine expression. *Diabetologia* 50: 654-665.
441. Gregoire, F. M., Smas, C. M., and Sul, H. S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiological reviews* 78: 783-809.
442. Wilson-Fritch, L., et al. (2004). Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest* 114: 1281-1289.
443. Roberts, R., et al. (2009). Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia* 52: 882-890.

444. Graham, T. E., and Kahn, B. B. (2007). Tissue-specific alterations of glucose transport and molecular mechanisms of intertissue communication in obesity and type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 39: 717-721.
445. Hedbacker, K., et al. (2010). Antidiabetic effects of IGFBP2, a leptin-regulated gene. *Cell Metab* 11: 11-22.
446. Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M., and Hotamisligil, G. S. (2008). Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 134: 933-944.
447. Anderka, O., Boyken, J., Aschenbach, U., Batzer, A., Boscheinen, O., and Schmolli, D. (2008). Biophysical characterization of the interaction between hepatic glucokinase and its regulatory protein: impact of physiological and pharmacological effectors. *J Biol Chem* 283: 31333-31340.
448. Argaud, D., Kirby, T. L., Newgard, C. B., and Lange, A. J. (1997). Stimulation of glucose-6-phosphatase gene expression by glucose and fructose-2,6-bisphosphate. *J Biol Chem* 272: 12854-12861.
449. An, J., Li, Y., van de, W. G., and Newgard, C. B. (2001). Overexpression of the P46 (T1) translocase component of the glucose-6-phosphatase complex in hepatocytes impairs glycogen accumulation via hydrolysis of glucose 1-phosphate. *J Biol Chem* 276: 10722-10729.
450. Cool, B., et al. (2006). Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 3: 403-416.
451. Aiston, S., Trinh, K. Y., Lange, A. J., Newgard, C. B., and Agius, L. (1999). Glucose-6-phosphatase overexpression lowers glucose 6-phosphate and inhibits glycogen synthesis and glycolysis in hepatocytes without affecting glucokinase translocation. Evidence against feedback inhibition of glucokinase. *J Biol Chem* 274: 24559-24566.
452. Seoane, J., et al. (1997). Metabolic impact of adenovirus-mediated overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in hepatocytes. *J Biol Chem* 272: 26972-26977.
453. Trinh, K. Y., O'Doherty, R. M., Anderson, P., Lange, A. J., and Newgard, C. B. (1998). Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *J Biol Chem* 273: 31615-31620.
454. van de, W. G., Lange, A., Newgard, C., Mechin, M. C., Li, Y., and Berteloot, A. (2000). New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur J Biochem* 267: 1533-1549.
455. Nordlie, R. C. (1976). *Glucose-6-phosphatase phosphotransferase, in Gluconeogenesis: Its regulation in Mammalian Species*, Wiley & Sons, New York.
456. Bebernitz, G. R., et al. (2009). Investigation of functionally liver selective glucokinase activators for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of medicinal chemistry* 52: 6142-6152.

457. Hutton, J. C., and O'Brien, R. M. (2009). Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family. *J Biol Chem* 284: 29241-29245.
458. Chou, J. Y., and Mansfield, B. C. (2008). Mutations in the glucose-6-phosphatase-alpha (G6PC) gene that cause type Ia glycogen storage disease. *Human mutation* 29: 921-930.
459. Bouatia-Naji, N., et al. (2008). A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels. *Science* 320: 1085-1088.
460. Wang, Y., et al. (2007). Deletion of the gene encoding the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein autoantigen results in a mild metabolic phenotype. *Diabetologia* 50: 774-778.
461. Rajas, F., Jourdan-Pineau, H., Stefanutti, A., Mrad, E. A., Ilyedjian, P. B., and Mithieux, G. (2007). Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochemistry and cell biology* 127: 555-565.
462. Jonges, G. N., Van Noorden, C. J., and Gossrau, R. (1990). Quantitative histochemical analysis of glucose-6-phosphatase activity in rat liver using an optimized cerium-diaminobenzidine method. *J Histochem Cytochem* 38: 1413-1419.
463. Nordlie, R. C. (1979). Multifunctional glucose-6-phosphatase: cellular biology. *Life sciences* 24: 2397-2404.
464. Foster, J. D., and Nordlie, R. C. (2002). The biochemistry and molecular biology of the glucose-6-phosphatase system. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J)* 227: 601-608.
465. Reiling, E., et al. (2009). Combined effects of single-nucleotide polymorphisms in GCK, GCKR, G6PC2 and MTNR1B on fasting plasma glucose and type 2 diabetes risk. *Diabetologia* 52: 1866-1870.
466. Davidson, A. L., and Arion, W. J. (1987). Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: physiological implications of higher cellular activity. *Archives of biochemistry and biophysics* 253: 156-167.
467. Salmon, D. M., and Flatt, J. P. (1985). Effect of dietary fat content on the incidence of obesity among ad libitum fed mice. *International journal of obesity* 9: 443-449.