

Impacte Metabòlic de l'Activació de la Glicogen Sintasa Hepàtica

Susana Ros Domínguez

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.tesisenxarxa.net) 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.tesisenred.net) 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.tesisenxarxa.net) 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.

Impacte metabòlic de l'activació de la glicogen sintasa hepàtica

SUSANA ROS DOMÍNGUEZ
Barcelona, Juny del 2009

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Memòria presentada per SUSANA ROS DOMÍNGUEZ, llicenciada en Biologia, per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona, Programa de Doctorat de Biotecnologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, Bienni 2003-2005.

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Joan J. Guinovart Cirera, Catedràtic de Bioquímica i Biologia Molecular, a l'Institut de Recerca Biomèdica (*IRB Barcelona*).

*Impacte metabòlic de l'activació de la glicogen
sintasa hepàtica*

El Director de la tesi

La interessada

Joan J. Guinovart Cirera

Susana Ros Domínguez

Barcelona, Juny del 2009

“El verdadero premio del científico está en hacer buenos experimentos, no en los premios que se le otorgan por eso.”

Luis Federico Leloir

Als meus pares

I. TAULA DE CONTINGUTS

I. TAULA DE CONTINGUTS	
II. ABREVIATURES	1
III. INTRODUCCIÓ	7
1. METABOLISME DEL GLICOGEN I VIES RELACIONADES	9
1.1 Estructura del glicogen	9
1.2 Control del metabolisme del glicogen	11
1.3 Síntesi del glicogen	13
1.3.1 Síntesi de glicogen : via directa	14
1.3.2 Síntesi de glicogen : via indirecta	15
1.4 Enzims clau en la síntesi de glicogen, diferències entre múscul i fetge	16
1.4.1 Transportadors de glucosa	16
1.4.2 Hexoquinases	17
1.4.1 Glicogen sintases	19
1.5 Degradació de glicogen	22
1.6 Enzims clau en la degradació del glicogen, la glicogen fosforilasa	23
1.7 Glicòlisi i gluconeogènesi	24
1.8 Enzims clau en la gluconeogènesi en fetge	27
1.8.1 Glucosa 6-fosfatasa	28
1.8.2 Fosfoenolpiruvat carboxiquinasa	30
1.8.3 Fructosa 1,6-bifosfatasa	32
2. DIABETIS I METABOLISME DEL GLICOGEN HEPÀTIC	34
2.1 Diabetis tipus I	34
2.2 Diabetis tipus II	36
2.3 Teràpies antidiabètiques	37
2.4 Estratègies que incrementen la deposició de glicogen hepàtic i millora de la diabetis	40
3. ADENOVIRUS	43
3.1 Avantatges i inconvenients dels adenovirus com a vectors de transferència gènica	44
3.2 Infecció d'hepatòcits per sistema adenoviral	46
IV. OBJECTIUS	49

V. RESULTATS I DISCUSSIÓ	53
1. PAPER DE LA FOSFORILACIÓ EN L'ACTIVITAT I DISTRIBUCIÓ SUBCEL·LULAR DE LA GLICOGEN SINTASA HEPÀTICA	
1.1 Introducció	55
1.2 Estudi del paper dels residus de fosforilació en l'activitat glicogen sintasa hepàtica	59
1.3 Estudi del paper dels residus de fosforilació en la síntesi de glicogen en la línia cel·lular d'hepatoma de rata FTO2B	62
1.4 Anàlisi d'interacció entre els llocs de fosforilació	65
1.5 Efectes de la mutació dels llocs de fosforilació de la LGS en la seva distribució subcel·lular	68
1.6 Estudi de la dissociació entre la translocació de LGS i la síntesi de glicogen	74
1.7 Discussió	79
2. EFECTES METABÒLICS DE L'EXPRESSIÓ HEPÀTICA DE LA LGS 2+3b EN RATA SANA	
2.1 Introducció	85
2.2 Efectes de l'expressió hepàtica de la LGS 2+3b en rates alimentades <i>ad libitum</i> o dejunades durant 18 hores	86
2.2.1 Estudi de l'expressió del transgen en diferents teixits	87
2.2.2 Quantificació de l'ARNm del gen de LGS en fetge	88
2.2.3 Activitat GS en fetge	89
2.2.4 Quantificació de proteïna LGS en fetge	91
2.2.5 Anàlisi macroscòpic del fetge	92
2.2.6 Quantificació de glicogen	93
2.2.7 Ultraestructura de biòpsies de fetge	94
2.2.8 Determinació del grau de ramificació del glicogen hepàtic	97
2.2.9 Glicèmia	98
2.2.10 Concentració plasmàtica d'insulina, triglicèrids, lactat i cossos cetònics	100
2.2.11 Expressió de la GP, GLUT 2, GK i la PEPCK en fetge	101
2.3 Test de tolerància a la glucosa	104
2.3.1 Glicèmia en test tolerància glucosa	104
2.3.2 Concentració plasmàtica d'insulina, triglicèrids, lactat i cossos cetònics a punt final de test de tolerància a glucosa	105
2.3.3 Quantificació de glicogen en fetge punt final del test de tolerància	106
2.3.4 Localització de la LGS 2+3b <i>in vivo</i>	107
2.4 Discussió	109

3. EFECTES METABÒLICS DE LA SOBREEXPRESSIÓ HEPÀTICA DE LGS 2+3b EN MODEL DE RATA DIABÈTICA TIPUS I (STZ)	
3.1 Introducció	113
3.2 Efectes de la sobreexpressió hepàtica de la LGS 2+3b en rates STZ alimentades <i>ad libitum</i> .	114
3.2.1 Estudi de l'expressió del transgen en diferents teixits	115
3.2.2 Quantificació de l'ARNm del gen de LGS en fetge	116
3.2.3 Activitat GS en fetge	116
3.2.4 Quantificació de proteïna LGS en fetge	118
3.2.5 Anàlisi macroscòpic del fetge	119
3.2.6 Quantificació de glicogen hepàtic	120
3.2.7 Determinació de la ramificació del glicogen hepàtic	121
3.2.8 Glicèmia	122
3.2.9 Concentració d'insulina, triglicèrids, lactat i cossos cetònics en plasma	123
3.2.10 Ingesta	124
3.2.11 Efectes sobre l'expressió i activitat de la GK i HKs	125
3.2.12 Efectes sobre l'expressió de la GP	127
3.3 Efectes de la sobreexpressió hepàtica de la LGS 2+3b en rata STZ dejunada	129
3.3.1 Activitat GS en fetge	130
3.3.2 Quantificació de proteïna LGS en fetge	131
3.3.3 Glicèmia	132
3.3.4 Quantificació de glicogen hepàtic	133
3.3.5 Ultraestructura de fetge	134
3.4 Discussió	137
4. ESTUDI DEL MECANISME QUE CONDUEIX A CANVIS EN LA GLICÈMIA PER SOBREEXPRESSIÓ DE LGS 2+3b EN RATES STZ	
4.1 Introducció	141
4.2 Efectes de la sobreexpressió de la LGS 2+3b sobre GLUT2 i les subunitats de la PP1 _{G_L} i PTG	142
4.3 Efectes de la sobreexpressió de la LGS 2+3b en l'expressió dels factors de transcripció HNF3 α i HNF3 β , i dels principals enzims gluconeogènics.	143
4.4 Efectes de la sobreexpressió de la LGS 2+3b en l'expressió de FOXO1, HNF-4 α , PGC1 α , SREBP-1c, ChREBP, C/EBP α i C/EBP β	146
4.5 Efectes de la sobreexpressió de la LGS 2+3b en l'activació de les quinases Akt/PKB, ERK en rates STZ	149
4.6 Efectes de la sobreexpressió hepàtica de la LGS 2+3b en l'expressió del receptor nuclear orfe SHP	151

4.7 Inducció de la gluconeogènesi en cultiu primari d'hepatòcits i efectes de la sobreexpressió de la LGS 2+3b	152
4.8 Discussió	158
VI. CONCLUSIONS	165
VII. MATERIAL I MÈTODES	171
1. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR	171
1.1 Reacció en cadena de la polimerasa	171
1.2 Electroforesi d'ADN	173
1.3 Quantificació d'ADN	174
1.4 Generació de bacteris competents	174
1.5 Transformació de bacteris	175
1.6 Obtenció d'ADN plasmídic	177
1.7 Seqüenciació de l'ADN	178
1.8 Obtenció d'ARN	179
1.9 Quantificació de l'ARN	180
1.10 Retrotranscripció de l'ARN	181
1.11 PCR quantitativa a temps real	181
2. GENERACIÓ D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS	182
2.1 Co-transfecció de cèl·lules 293 per l'obtenció d'adenovirus	183
2.2 Clons d'adenovirus. Assaig en placa	184
2.3 Extracció de l'ADN viral. Mètode de Hirt	185
2.4 Amplificació d'adenovirus	186
2.5 Concentració d'adenovirus per gradient de clorur de cesi	186
2.6 Infecció de cèl·lules en cultiu	188
3. CULTIU CEL·LULAR DE LÍNIES ESTABLES	189
3.1 Cèl·lules 293	189
3.2 Cèl·lules FTO2B	189
3.3 Manteniment de cultius cel·lulars	189
4. PROCEDIMENTS AMB ANIMALS	190
4.1 Tipus d'animals usats	190
4.2 Cultiu primari d'hepatòcits	191
2.3.4 Localització de la LGS 2+3b <i>in vivo</i>	107
4.3 Injecció intravenosa d'adenovirus purificats	192
4.4 Test de tolerància a la glucosa	192

5. DETERMINACIÓ I SEPARACIÓ DE PROTEÏNES	193
5.1 Concentració proteica	193
5.2 Western blot	193
6. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES	196
6.1 Determinació de l'activitat GS	196
6.2 Determinació de l'activitat GK i HKs	197
6.3 Determinació de l'activitat GP	198
7. DETERMINACIÓ DE METABÒLITS	199
7.1 Determinació de la quantitat de glicogen	199
7.2 Determinació de la ramificació del glicogen	199
7.3 Determinació de paràmetres plasmàtics	200
8. TÈCNiques D'IMMUNOFUORESCÈNCIA	201
8.1 Immunofluorescència. Cèl·lules crescudes sobre cubreobjectes	201
8.2 Immunofluorescència. Teixits	202
9. MICROSCOPIA CONFOCAL	204
10. MICROSCOPIA ELECTRÒNICA	204
11. ANÀLISI ESTADÍSTIC	205
VIII. BIBLIOGRAFIA	207
IX. ANNEX	237

II. ABREVIATURES

AAV	adenovirus adenoassociats
AC	adenilat ciclase
Ad	adenovirus
AMP	adenosina 5'-monofosfat
AMPc	adenilmonofosfat cíclic
AMPK	proteïna quinasa estimulada per AMP
ATF3	<i>activating transcription factor 3</i>
Bgal	b-galactosidasa
BE	enzim ramificant del glicogen
bp	parells de bases nucleotídiques
BSA	albúmina de sèrum boví
Bt2cAMP	N6,O2-dibutiriladenosina 3:5- monofosfat cíclic
CAR	receptor de coxsackievirus i adenovirus
CCK	cholecistoquinina
C/EBP	<i>CCAAT enhancer binding proteins</i>
ChREBP	element de resposta a carbohidrats
CK	caseïna quinasa
CRE	element de resposta a AMPc
CREB	<i>CRE binding protein</i>
Da	dalton
DBE	enzim desramificant del glicogen
Dexa	dexametasona
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ERK1/2	quinasa regulada per senyals extracel·lulars
FAS	sintasa d'àcids grassos
FBPasa	fructosa 2,6-bifosfat
FBS	sèrum fetal boví
FOXA1	factor nuclear hepatic 3 α , HNF-3 α
FOXA2	factor nuclear hepatic 3 β , HNF-3 β
FOXO1	<i>forkhead box O1</i>

GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GFP	proteïna verda fluorescent
GK	glucoquinasa
GKRP	proteïna reguladora de la glucoquinasa
GN	glicogenina
Glc1P	glucosa 1-fosfat
Glc6P	glucosa 6-fosfat
GP	glicogen fosforilasa
GR	receptor de glucocorticoides
GRU	unitat de desposta a glucocorticoides
GS	glicogen sintasa
G6Pasa	glucosa 6-fosfatasa
GSK-3	glicogen sintasa quinasa 3
HK	hexoquinasa
HNF	factor nuclear hepàtic
HSPG	proteoglicans de tipus heparina sulfat
kDa	kilodaltons
LGS	glicogen sintasa de fetge
LPK	piruvat quinasa de fetge
LRP	receptor lipoproteic
LXR	<i>liver X-activated receptor</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MGS	glicogen sintasa muscular
MLP	promotor tardà major
MMLV	<i>retrovirus leukemia murina de Moloney</i>
MOI	multiplicitat d'infecció
MODY	<i>maturity onset diabetes of the young</i>
MPK	MAP quinasa fosfatasa
NF1	<i>nuclear factor 1</i>
NIDDM	diabetis mellitus no dependent d'insulina

Pc	piruvat carboxiquinasa
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PEPCK	fosfoenolpiruvat carboxiquinasa
PFK-1	fosfofructoquinasa
pfu	unitats formadores de calva
PGC-1 α	<i>PPARγ coactivador 1α</i>
PhK	fosforilasa quinasa
PKA	proteïna quinasa dependent d'AMPc
PKB/Akt	proteïna quinasa B
PKC	proteïna quinasa C
p90RSK	<i>p90 ribosomal S6 kinase</i>
PP1	proteïna fosfatasa-1
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator activated receptor γ</i>
PTG	<i>protein targeting to glycogen</i>
RXR	<i>retinoic X receptor</i>
ROR α	<i>retinoid-related orphan receptor α</i>
RT-Q-PCR	PCR quantitativa en temps real
SHP	<i>small heterodimer partner</i> , receptor nuclear orfe nr0b2
SRC-2	<i>steroid receptor coactivator 2</i>
SREBP-1c	<i>sterol regulatory element binding protein</i>
STZ	estreptozotocina
TORC2	<i>transduced of regulated CREB activity 2</i>
UDPG	uridina difosfat-glucosa