

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

RESULTATS i DISCUSSIÓ: CAPÍTOL 4

ESTUDI DEL MECANISME QUE CONDUEIX A CANVIS EN LA GLICÈMIA PER SOBREEXPRESSIONI DE LGS 2+3b EN RATES STZ

4.1 Introducció

És necessari establir el mecanisme pel qual la sobreexpressió de la LGS 2+3b en fetge de rata diabètica STZ causa disminució en la glicèmia dels animals. En aquest capítol s'estudia si a més a més de l'augment en la deposició de glicogen hepàtic, hi participen canvis compensatoris en d'altres enzims involucrats en el metabolisme de la glucosa.

Els inhibidors específics de GSK-3 simulen l'efecte de la insulina de promoure la conversió de la glucosa a glicogen, doncs activen la LGS i estimulen la deposició de glicogen en línies cel·lulars hepàtiques (Coghlan, Culbert et al. 2000). A més, el tractament de línies cel·lulars hepàtiques amb inhibidors de la GSK3 produeix una disminució en la transcripció de la PEPCK i la G6Pasa (Bosch, Rodriguez-Gil et al. 1992; Lochhead, Coghlan et al. 2001), el que suposa una reducció en la gluconeogènesi, per un mecanisme desconegut i independent de l'activació de la PKB o la inhibició del factor de transcripció FOXO1. El tractament de rates ZDF diabètiques tipus II amb aquests compostos produeix una millor tolerància a la glucosa, una restauració de la síntesi de glicogen en el fetge i un augment moderat en la síntesi de glicogen en el múscul (Cline, Johnson et al. 2002). Així doncs aquests compostos disminueixen la glicèmia en models de diabetis tipus II, a través d'un augment de la síntesi de glicogen hepàtic i una disminució de la gluconeogènesi.

Els resultats presentats en el capítol anterior demostraven que la sobreexpressió de la LGS 2+3b en rates diabètiques STZ, alimentades *ad libitum*, era capaç de restaurar la síntesi de glicogen en el fetge. En aquest capítol es va marcar com objectiu estudiar si a

més a més la sobreexpressió de la LGS 2+3b conduïa a una reducció en la gluconeogènesi per disminució en la transcripció dels principals enzims que hi participen. També es va analitzar si es modificava l'expressió d'altres proteïnes involucrades en el metabolisme de la glucosa, l'expressió de les quals es troba modificada en la diabetis.

4.2 Efectes de la sobreexpressió de la LGS 2+3b sobre GLUT2 i les subunitats de la PP1 G_L i PTG.

L'expressió del transportador GLUT-2 es troba augmentada en diabetes, tot i que aquesta es rectifica quan la hiperglucèmia es corregeix per l'administració d'insulina exògena (Burcelin, Eddouks et al. 1992). En el nostre cas, no s'observava cap modificació en GLUT-2 en el fetge de les rates STZ alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b, si es comparava amb els resultats dels grups de rates STZ que sobreexpressaven la Bgal o la LGS WT (*Fig.1*).

Igualment, en la diabetis trobem defectes en la quantitat d'ARNm i de proteïna de les subunitats de la PP1 G_L i PTG, que es recuperen per tractament amb insulina (Doherty, Cadefau et al. 1998; Browne, Delibegovic et al. 2001). L'abundància de l'ARNm de G_L no variava degut a la sobreexpressió de les diferents proteïnes en el fetge de les rates STZ (*Fig.1*). Curiosament però, es produïa una reducció en la quantitat d'ARNm de PTG en el fetge de les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b, si es comparava amb l'expressió en la resta de grups.

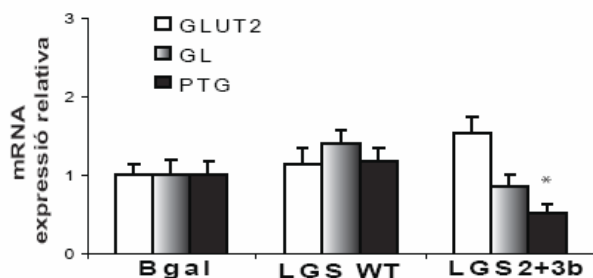


Fig.1 Anàlisi de la quantitat d'ARNm de GLUT2, GL i PTG. Anàlisi per RT-Q-PCR de l'expressió relativa del GLUT2, GL i PTG en el fetge de les rates STZ alimentades que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT i la LGS 2+3b. En tots els casos els valors representen la mitjana \pm S.E.M de 7 rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ que

sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. El símbol indica diferència significativa amb $*p < 0,05$ per comparació amb el grup de rates STZ que sobreexpressen la Bgal.

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.

El factor de transcripció HNF3 β , o FOXA2, s'uneix al promotor de la PTG i el transactiva en línies cel·lulars hepàtiques (Cheng, Zhang et al. 2006). Per tant, es va estudiar si l'expressió d'aquest factor es trobava alterada en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Tanmateix, no es van trobar canvis significatius ni en la quantitat d'ARNm de HNF3 β o FOXA2 ni en la del factor HNF3 α o FOXA1 (**Fig.2**).

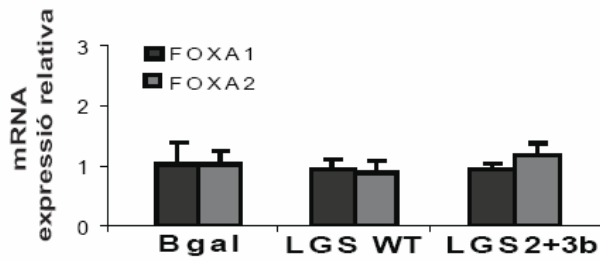


Fig.2 Anàlisi de la quantitat d'ARNm de FOXA1 i FOXA2. Anàlisi per RT-Q-PCR de l'expressió relativa de FOXA1 (HNF-3 α) i FOXA2 (HNF-3 β) en el fetge de les rates STZ que havien restat alimentades i que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b. En tots els casos els valors representen la mitjana \pm S.E.M de 7 rates

STZ que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b.

Hi havia la possibilitat, però, que fos l'activitat transcripcional del factor HNF-3 β la que es trobés modificada en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. A més, l'HNF-3 β juga un paper clau en la regulació transcripcional dels enzims que participen en el programa gluconeogènic (Zhang, Rubins et al. 2005). Així doncs, es va determinar si l'expressió gènica dels principals enzims que participen en la gluconeogènesi es trobava alterada per la sobreexpressió de la LGS 2+3b. Els resultats demostren que hi havia una reducció en la quantitat d'ARNm de FBPasa, G6Pasa i PEPCK en el fetge de les rates STZ alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b, en canvi no es trobaven diferències d'expressió del gen de la Pc (**Fig.3**).

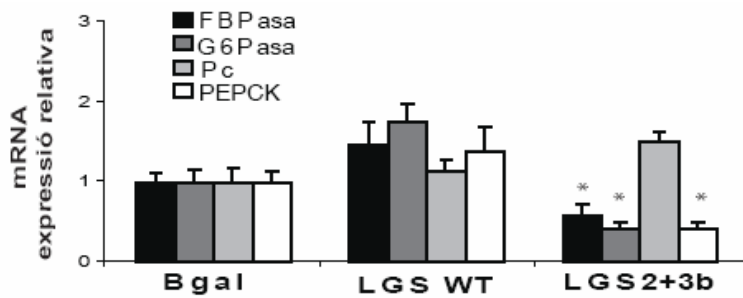


Fig.3 Anàlisi de la quantitat d'ARNm de FBPasa, G6Pasa, Pc i PEPCK. Anàlisi per RT-Q-PCR de l'expressió relativa de la FBPasa, la G6Pasa, la Pc i la PEPCK en el fetge de les rates STZ que havien restat

alimentades que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b. En tots els casos els valors representen la mitjana \pm S.E.M de 7 rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. El símbol indica diferència significativa amb $*p < 0,05$ per comparació amb el grup de rates STZ que sobreexpressen la Bgal.

Com disposàvem d'un anticòs que reconeixia la PEPCK, es va comprovar si la quantitat de proteïna també es trobava disminuïda. Els resultats mostraven que hi havia un augment en la quantitat de proteïna en el fetge de les rates STZ respecte a les rates sanes (**Fig.4**). A part, s'observà que les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b tenien menys quantitat de proteïna respecte als altres grups de rates STZ, i aquesta quantitat era semblant a la de les rates sanes que sobreexpressaven la Bgal. Aquesta disminució en l'enzim PEPCK en les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b podia contribuir a la disminució de la glicèmia observada en els animals (**Capítol 3**).

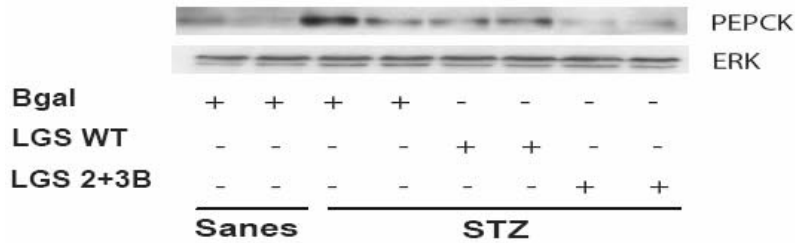


Fig.4 Anàlisi de la proteïna PEPCK. Anàlisi representatiu de dos a tres extractes de fetge dels grups de rates sanes que sobreexpressaven la Bgal, i rates STZ que

sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b, amb anticossos contra la PEPCK o la MAPquinasa ERK (ERK) com a control de càrrega, els grups analitzats havien restat alimentats. En tots els casos s'han analitzat 20 µg de proteïna per carril.

4.4 Efectes de la sobreexpressió de la LGS 2+3b en l'expressió de FOXO1, HNF-4α, PGC1α, SREBP-1c, ChREBP, C/EBPα i C/EBPβ

Es va examinar l'expressió d'altres factors de transcripció que podien intervenir en la regulació transcripcional de la PEPCK, la G6Pasa i la FBPasa.

La proteïna coactivadora PGC-1α augmenta l'expressió dels gens de la PEPCK i la G6Pasa, per unió al factor de transcripció Foxo1 i al receptor nuclear HNF-4α (Hanson and Reshef 1997). A més, el factor de transcripció SREBP-1c interacciona amb el receptor nuclear HNF-4α, el que impedeix la unió amb la PGC-1α, i d'aquesta manera causa la supressió de l'expressió de la PEPCK, la G6Pasa i la FBPasa (Yamamoto, Shimano et al. 2004). Per tant, es va determinar si hi havia variacions en l'abundància d'ARNm d'aquests factors per sobreexpressió de la LGS 2+3b (**Fig.5**), però els resultats demostraven però que no es produïen canvis significatius entre els diferents grups.

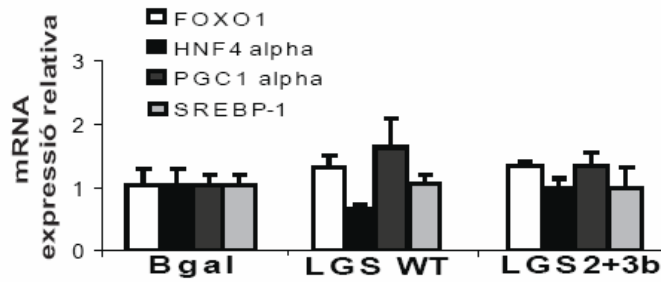


Fig.5 Anàlisi de l'abundància d'ARNm dels factors de transcripció *Foxo1* i *SREBP-1*, del receptor nuclear *HNF4α*, i de la proteïna coactivadora *PGC1α*. Anàlisi per RT-Q-PCR de l'expressió relativa de *Foxo1*, *HNF4α*, *PGC1α* i *SREBP-1c* en el fetge de les rates STZ alimentades que sobreexpressaven la *Bgal*, la *LGS WT* o la *LGS 2+3b*. En tots els casos els valors representen la mitjana \pm S.E.M de 7 rates STZ que sobreexpressaven la *Bgal*, 6 rates STZ que sobreexpressaven la *LGS WT* i 5 rates STZ que sobreexpressaven la *LGS 2+3b*.

La insulina o la glucosa estimulen la transcripció dels receptors nuclears LXR (*Liver X-activated receptors*), que coordinen el metabolisme de lípids i glucosa. La seva activació indueix l'expressió del gen de la *SREBP-1c* i reprimeix l'expressió dels gens de la *PEPCK*, la *G6Pasa* i la *FBPasa* (Stulnig, Steffensen et al. 2002; Cao, Liang et al. 2003). Tanmateix, la transcripció de l'element de resposta a carbohidrats (*ChREBP*), que controla gens involucrats tant en la glicòlisi, la lipogènesi com la gluconeogènesi, es troba regulada per l'acció d'aquests receptors nuclears LXR (Cha and Repa 2007; Mitro, Mak et al. 2007). Com s'ha comentat anteriorment, la quantitat d'ARNm de *SREBP-1c* no estava modificada per la sobreexpressió de la *LGS 2+3b* en el fetge de rates STZ, però es va comprovar si l'expressió del *ChREBP*, qui també està regulat pels LXR, es trobava alterada. Els resultats demostraven que la quantitat d'ARNm de l'element *ChREBP* tampoc es trobava modificada per sobreexpressió de la *LGS 2+3b* en rates STZ (**Fig. 6**).

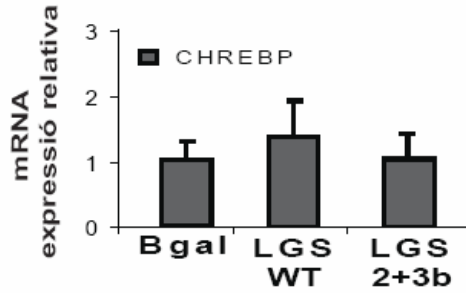


Fig.6 Anàlisi de la quantitat d'ARNm de ChREBP. Anàlisi per RT-Q-PCR de l'expressió relativa de ChREBP en el fetge de les rates sanes que sobreexpressaven la β -galactosidasa (Bgal) o les rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, la glicogen sintasa de fetge salvatge (LGS WT), o la glicogen sintasa de fetge mutada en les serines 2 i 3b (LGS 2+3b). En tots els casos els valors representen la mitjana \pm S.E.M de 7 rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates

STZ que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b.

En la diabetis induïda per STZ l'expressió del factor de transcripció C/EBP β es troba incrementada, i la del C/EBP α es troba disminuïda, el que es reverteix amb el tractament d'insulina (Bosch, Sabater et al. 1995). A més, el factor de transcripció C/EBP β juga un paper clau en la regulació transcripcional de la PEPCK i la G6Pasa (Bosch, Sabater et al. 1995; Arizmendi, Liu et al. 1999). Per tant, es va quantificar si l'abundància de l'ARNm d'aquests factors de transcripció es trobava modificada per la sobreexpressió de la LGS 2+3b en el fetge de les rates STZ. Els resultats demostraven que no hi havia cap canvi en l'expressió gènica del factor C/EBP α (Fig. 7). En canvi la quantitat d'ARNm del factor C/EBP β es trobava disminuïda en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b, el que pot contribuir a la reducció de la quantitat d'ARNm de PEPCK i G6Pasa.

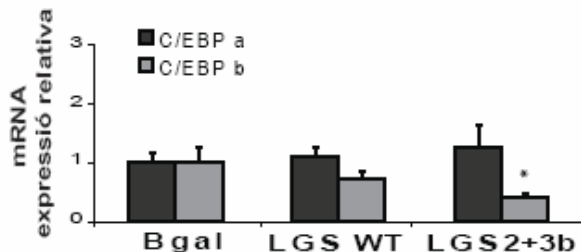


Fig.7 Anàlisi de la quantitat d'ARNm de C/EBP α i C/EBP β . Anàlisi per RT-Q-PCR de l'expressió relativa dels gens de C/EBP α i C/EBP β en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b. En tots els casos els valors representen la mitjana \pm S.E.M de 7 rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates

STZ que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. El símbol indica diferència significativa amb * $p < 0,05$ per comparació amb el grup de rates STZ que sobreexpressen la Bgal.

4.5 Efectes de la sobreexpressió de la LGS 2+3b en l'activació de les quinases Akt/PKB, ERK en rates STZ

La quinasa Akt/PKB fosforila al factor de transcripció FOXO1, i en conseqüència aquest es reté al citoplasma, així no pot interaccionar amb la proteïna coactivadora PGC-1 α , i conseqüentment es produeix una reducció en la transcripció dels gens dels principals enzims gluconeogènics (Brunet, Bonni et al. 1999; Rena, Guo et al. 1999; Puigserver, Rhee et al. 2003; Li, Monks et al. 2007). Per tant, podia ésser que la sobreexpressió de la LGS 2+3b conduís a l'activació de la quinasa Akt/PKB. Els resultats però demostraren que no es produïa cap alteració aparent en l'activitat d'aquesta quinasa en les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b que havien restat sempre alimentades, quan s'analitzava per Western blot la quantitat de quinasa fosforilada en dos residus clau per a la seva activació, la treonina 308 i la serina 473 (**Fig.8**).

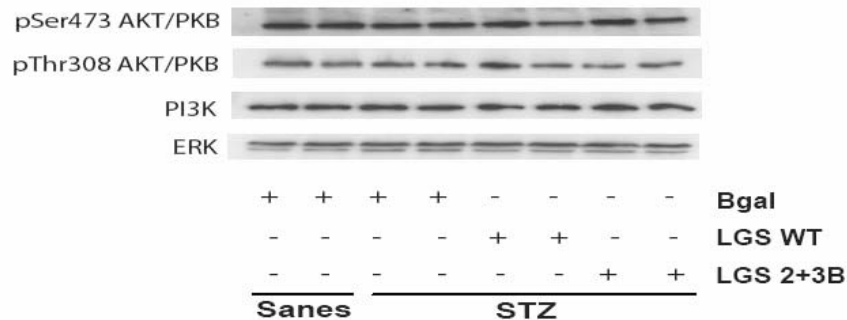


Fig.8 Anàlisi de la fosforilació de la quinasa Akt/PKB en fetge de les rates STZ Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b. Anàlisi representatiu de dos a tres extractes de fetge dels grups de rates sanes que sobreexpressaven la Bgal, rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT i la LGS 2+3b, amb anticossos contra l'enzim Akt/PKB fosforilat en el residu Ser 473 (pSer473 Akt/PKb), i en el residu Thr 308 (pThr 308 Akt/PKb), la quinasa PI3K i la MAPquinasa ERK (ERK) com a controls de càrrega. En tots els casos s'han analitzat 20 μ g de proteïna per carril.

Es troba descrit que una activació de la quinasa ERK1/2, que pertany a la via de les MAP quinases Raf/MEK/ERK1/2, condueix a la supressió de la transcripció de la PEPCK i la G6Pasa (Gabbay, Sutherland et al. 1996; Schmoll, Grempler et al. 2001). Per tant, s'estudià si la fosforilació, i per tant activació, d'aquesta quinasa es trobava modificada per la sobreexpressió de la LGS 2+3b. Els resultats mostraven que la quantitat d'ERK1/2 fosforilada era major en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b respecte als altres grups de rates STZ (**Fig.9**). La quinasa p90RSK, un dels substrats de la quinasa ERK1/2, està involucrada en la fosforilació i per tant inactivació de la GSK3 (Sutherland, Leighton et al. 1993). El fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b presentaven un augment en la quantitat de p90RSK fosforilada en el residu Ser380 i un augment moderat en la fosforilació de la quinasa GSK-3 beta en la Ser9.

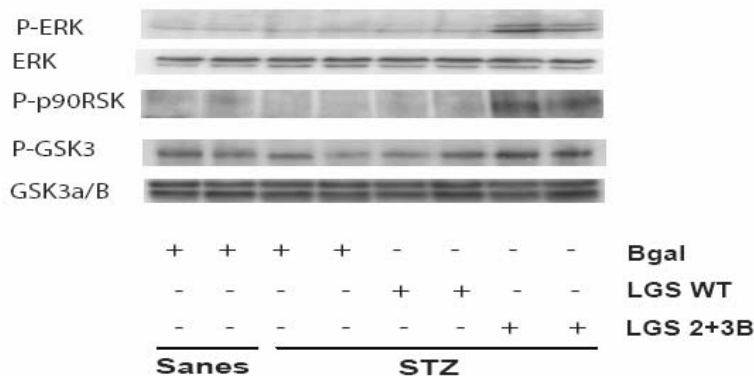


Fig.9 Efectes en la fosforilació d'ERK, p90RSK i GSK3. Anàlisi representatiu dels homogenats de dos a tres extractes de fetge dels grups de rates sanes que sobreexpressaven la Bgal, rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b, amb anticossos contra la MAPquinasa ERK fosforilada (P-ERK), la MAPquinasa ERK (ERK), la p90RSK fosforilada (P-p90RSK), la GSK-3 fosforilada (P-GSK3) i la GSK-3 total (GSK3 a/B). En tots els casos s'han analitzat 20 µg de proteïna per carril.

4.6 Efectes de la sobreexpressió hepàtica de la LGS 2+3b en l'expressió del receptor nuclear orfe SHP

L'SHP és un receptor nuclear orfe que reprimeix l'activitat transcripcional de múltiples receptors nuclears i factors de transcripció, entre aquests l'HNF-4 α , el FOXO1 (Yamagata, Daitoku et al. 2004) i l'HNF-3 β (Kim, Kim et al. 2004), que com s'ha comentat prèviament regulen l'expressió de la PEPCK, la G6Pasa i la FBPasa (Yamagata, Daitoku et al. 2004). Per tant, s'estudià si la transcripció d'aquest receptor nuclear orfe es trobava modificada per sobreexpressió de la LGS 2+3b en rates STZ. El resultat mostrà que hi havia un augment en la quantitat d'ARNm de SHP en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b respecte als altres grups de rates de l'estudi (**Fig.10**).

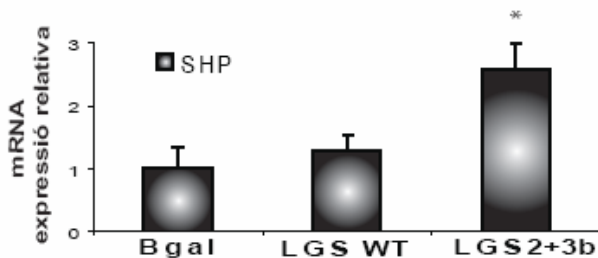


Fig.10 Efectes sobre l'abundància d'ARNm de SHP. Anàlisi per RT-Q-PCR de l'expressió relativa del SHP en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b. En tots els casos els valors representen la mitjana \pm S.E.M de 7

rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. El símbol indica diferència significativa amb * $p < 0,05$ per comparació amb el grup de rates STZ que sobreexpressen la Bgal.

La transcripció de l'SHP pot ésser induïda per múltiples factors. L'activació de la quinasa AMPK, pot conduir a un augment de l'expressió d'SHP, el que conseqüentment comporta a la reducció en l'expressió gènica de la PEPCK i la G6Pasa (Kim, Park et al. 2008). La regulació de l'AMPK involucra activació al·lostèrica per AMP, i en un segon

nivell de regulació aquest unió a AMP produeix que la quinasa sigui fosforilada reversiblement en el residu Thr172 de la subunitat catalítica α (Suter, Riek et al. 2006). Com disposàvem d'un anticòs que reconeixia la forma fosforilada d'AMPK, es va comprovar si hi havia canvis d'aquesta forma de la quinasa per sobreexpressió de la LGS 2+3b. Els resultats però demostraren es produïa un lleuger augment en la fosforilació de la quinasa en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b respecte a la resta de grups de rates (**Fig.11**).

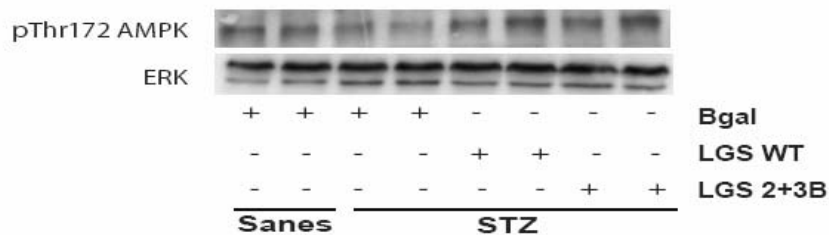


Fig.11 Efectes en la fosforilació d'AMPK. Anàlisi representatiu dels homogenats de dos a tres extractes de fetge dels grups de rates sanes que sobreexpressaven la Bgal, rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b, amb anticòssos contra la MAPquinasa ERK fosforilada (P-ERK), la MAPquinasa ERK (ERK), la p90RSK fosforilada (P-p90RSK), la GSK-3 fosforilada (P-GSK3) i la GSK-3 total (GSK3 a/B). En tots els casos s'han analitzat 20 μ g de proteïna per carril.

4.7 Inducció de la gluconeogènesi en cultiu primari d'hepatòcits i efectes de la sobreexpressió de la LGS 2+3b.

Per tal de profunditzar en l'estudi dels efectes de la sobreexpressió de la LGS 2+3b, es va dissenyar un sistema d'inducció dels enzims gluconeogènics en cultiu primari d'hepatòcits mitjançant tractament amb una barreja de dexametasona 100nM i de Bt_2AMPc 0,3mM en presència de glucosa 25mM. Els hepatòcits van ésser infectats amb adenovirus que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT, la LGS 2+3b, la LGS E509A i la LGS 2+3b E509A, i paral·lelament tractats amb aquesta barreja. Es va deixar expressar

les diferents proteïnes en presència de la barreja durant 3 o 24 hores, passats aquests temps es va procedir a congelar i processar els hepatòcits.

Si mesuràvem l'activitat GS total en presència de Glc6P, tant en els hepatòcits que sobreexpressaven la LGS E509A com la LGS 2+3b E509A, observàvem que aquesta era idèntica a la dels hepatòcits que sobreexpressaven la Bgal (**Fig. 12A**), doncs la mutació del residu glutàmic en posició 509 produeix un enzim catalíticament inactiu, com s'ha comentat anteriorment (**Capítol 1**). Només els extractes dels hepatòcits que sobreexpressaven la LGS 2+3b presentaven un increment en l'activitat GS mesurada en absència de Glc6P (**Fig. 12B**) (**Capítol 1**).

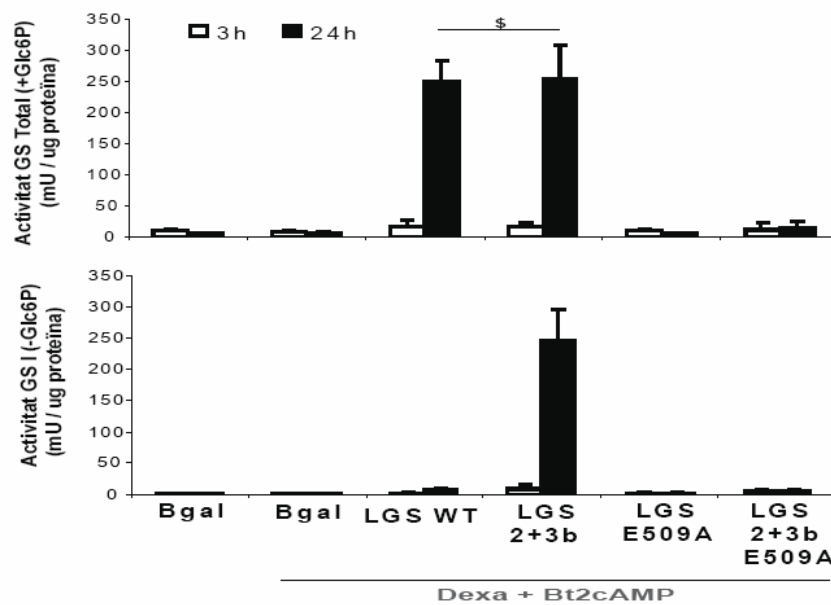


Fig.12 Sobreexpressió de les diferents formes de LGS en hepatòcits no tractats o tractats amb una barreja de dexametasona i Bt_2AMPc . **A)** Activitat GS total dels homogenats d'hepatòcits tractats amb medi amb glucosa 25mM sense o amb tractament amb una barreja de 100nM dexametasona i 0,3mM Bt_2AMPc durant 3 (barres blanques) o 24 hores (barres negres), que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT, la LGS 2+3b, la LGS E509A i la LGS 2+3b E509A. **B)** Activitat GS mesurada en absència de Glc6P dels homogenats anteriorment comentats. En tots els casos (**A** i **B**) l'activitat està expressada en mU per mg de proteïna. Els valors representen la mitjana \pm S.E.M. de quatre a sis experiments independents. El símbol \$ indica sense diferència significativa per comparacions amb els extractes d'hepatòcits que sobreexpressaven LGS WT.

L'anàlisi per Western blot dels extractes d'aquests hepatòcits va mostrar que s'estaven sobreexpressant quantitats semblants de proteïna LGS en tots els casos, i que la LGS 2+3b i la LGS 2+3b E509A presentaven una mobilitat electroforètica incrementada (**Fig. 13**).

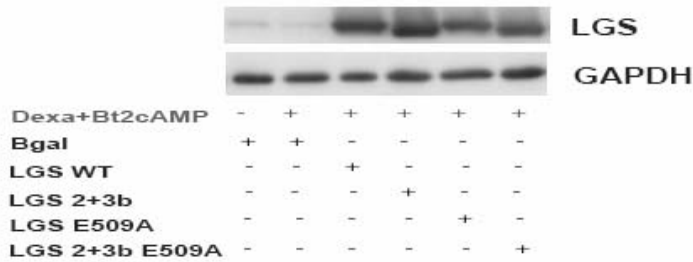


Fig.13 Expressió de la proteïna LGS en els hepatòcits incubats amb una barreja de dexametasona i Bt₂AMPc.

Anàlisi per Western blot dels extractes dels homogenats d'hepatòcits incubats en medi amb glucosa 25mM amb o sense

dexametasona 100nM i Bt₂AMPc 0,3mM durant 24 hores, que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT, la LGS 2+3b, la LGS E509A i la LGS 2+3b E509A, utilitzant l'anticòs L1 contra la LGS i l'anticòs contra la GAPDH com a control de càrrega (20 µg de proteïna per carril).

Un cop establert que s'estaven sobreexpressant quantitats similars de les diferents formes de LGS, es va analitzar l'expressió gènica de PEPCK i G6Pasa entre els diferents grups, mitjançant la determinació de la quantitat d'ARNm dels dos enzims. Els resultats mostren que només en el cas dels hepatòcits que sobreexpressaven la LGS LGS 2+3b es produïa una disminució en la quantitat d'ARNm dels gens gluconeogènics (**Fig. 14**). Així doncs, es pot concloure que l'increment en glicogen era el causant de la repressió dels gens de la G6Pasa i la PEPCK, doncs els hepatòcits que sobreexpressaven la LGS catalíticament inactiva però modificada en els centres de fosforilació 2 i 3b presentaven uns nivells d'ARNm de PEPCK i G6Pasa semblants a la de la resta d'hepatòcits tractats amb dexametasona i Bt₂cAMP.

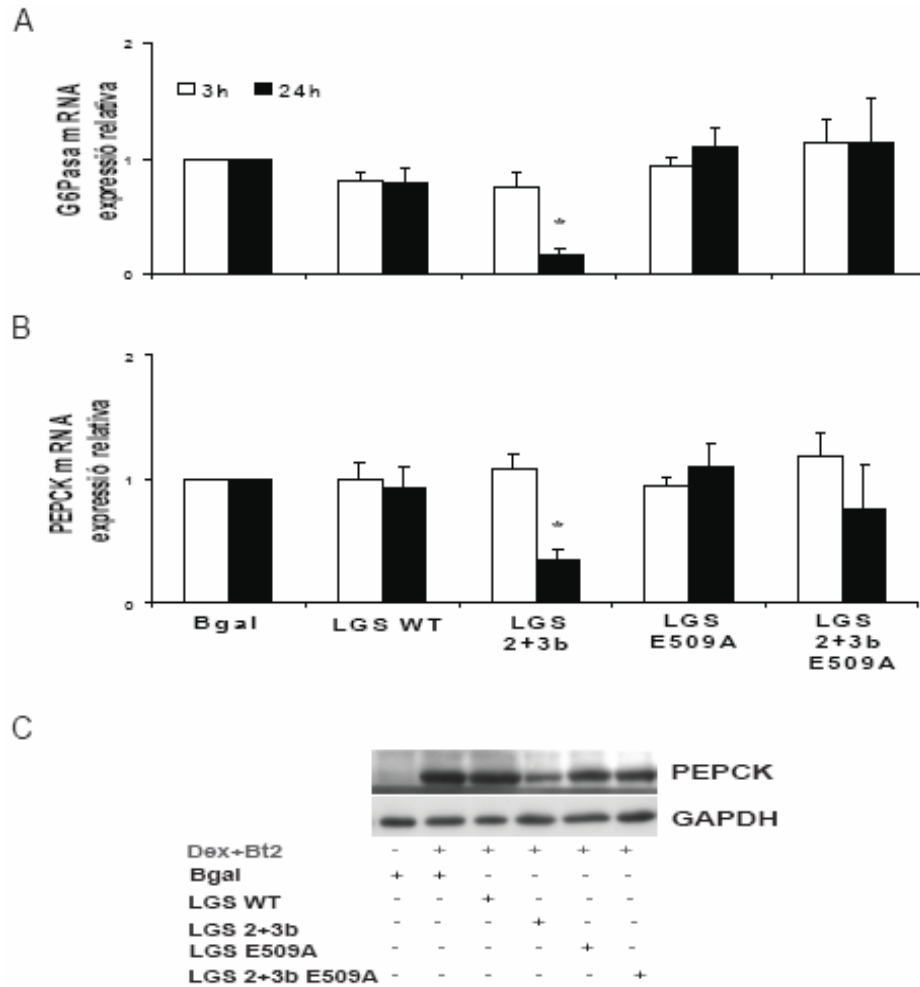


Fig.14 Anàlisi per RT-Q-PCR de l'abundància d'ARNm de PEPCK i G6Pasa i sobre la proteïna PEPCK en els hepatòcits incubats amb una barreja de dexametasona i Bt₂AMPc. A) Anàlisi per RT-Q-PCR de l'abundància d'ARNm de G6Pasa (A) i PEPCK (B) dels d'hepatòcits tractats amb medi amb glucosa 25mM amb dexametasona 100nM i Bt₂AMPc 0,3mM durant 3 o 24 hores, que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT, la LGS 2+3b, la LGS E509A i la LGS 2+3b E509A. En tots els casos (A i B) els valors representen la mitjana ± S.E.M.. de quatre a sis experiments independents. El símbol indica diferències significatives amb * $p < 0,05$ per comparacions amb els extractes d'hepatòcits induïts que sobreexpressaven Bgal. C) Anàlisi per Western blot dels homogenats d'hepatòcits no tractats que sobreexpressaven la Bgal o tractats durant 24 hores amb dexametasona 100nM i Bt₂AMPc 0,3mM i que sobreexpressaven les diferents proteïnes comentades en el punt A utilitzant un anticòs contra la PEPCK i l'anticòs contra la GAPDH com a control de càrrega (20 µg de proteïna per carril).

Es va comprovar si en aquest sistema es reproduïen els efectes que havíem detectat en les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Els resultats mostraven que en els hepatòcits tractats amb dexametasona i Bt₂AMPc que sobreexpressaven la LGS 2+3b la quinasa ERK1/2 estava més fosforilada, tal i com succeïa en el grup de rates LGS 2+3b STZ (**Punt 4.5**). A més, la quantitat d'ERK1/2 fosforilada es trobava disminuïda en els hepatòcits tractats amb dexametasona i Bt₂AMPc respecte als hepatòcits no tractats, doncs els glucocorticoides inhibeixen l'activació d'ERK1/2 per increment de l'expressió de la MAP quinasa fosfatasa-1 (MKP-1) i la disminució en la seva degradació (Kassel, Sancono et al. 2001; Lasa, Abraham et al. 2002).

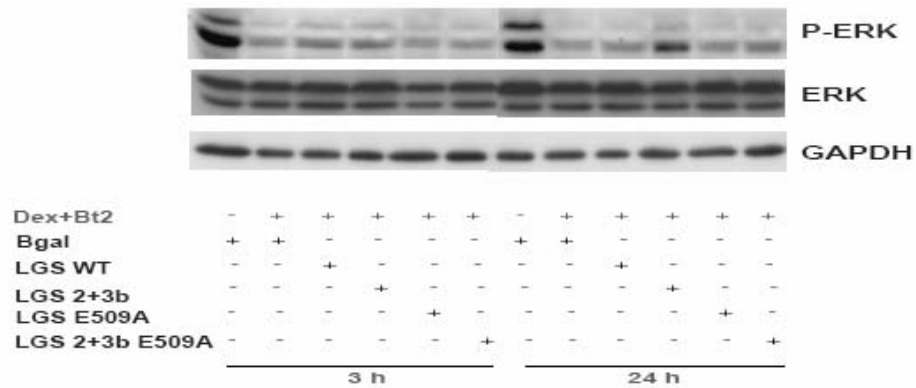


Fig.15 Expressió de la proteïna ERK 1/2 fosforilada en els hepatòcits incubats amb una barreja de dexametasona i Bt₂AMPc. Anàlisi per Western blot dels homogenats d'hepatòcits no tractats o tractats amb dexametasona 100nM i Bt₂AMPc 0,3mM que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT, la LGS 2+3b, la LGS E509A i la LGS 2+3b E509A utilitzant un anticòs contra ERK 1/2 fosforilada, ERK 1/2 total o l'anticòs contra la GAPDH com a control de càrrega, s'ha analitzat 20 µg de proteïna per carril.

A més, s'estudià si la transcripció del receptor nuclear orfe SHP es trobava modificada per sobreexpressió de la LGS 2+3b. Hi havia un increment en la quantitat d'ARNm d'SHP en els hepatòcits que sobreexpressaven la LGS 2+3b a les 3 hores post tractament amb la barreja de dexametasona i Bt₂AMPc (**Fig. 16**), el que encara era més evident a les 24 hores, on l'expressió relativa de la LGS era major degut al temps transcorregut.

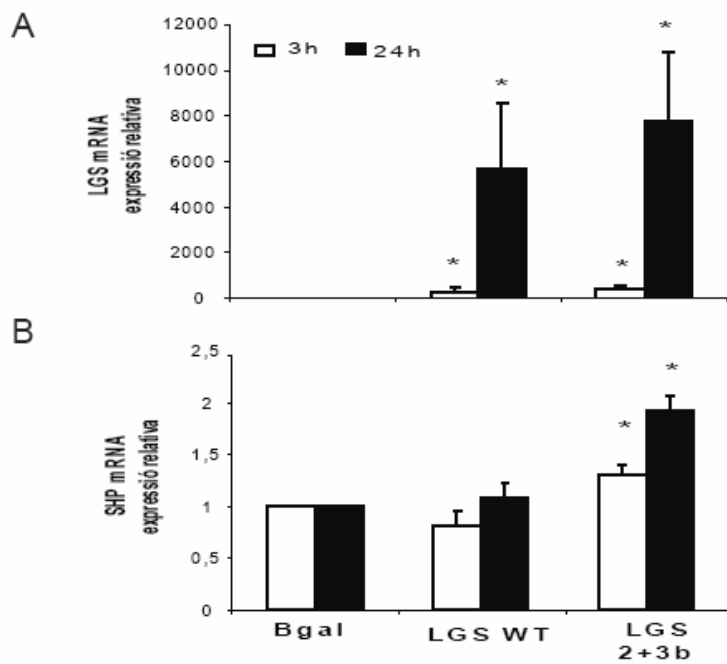


Fig.16 Anàlisi per RT-Q-PCR de l'abundància d'ARNm del receptor nuclear orfe SHP en els hepatòcits dexametasona i Bt_2AMPc . Anàlisi per RT-Q-PCR de l'expressió relativa de LGS (A) i SHP (B) dels d'hepatòcits infectats amb els adenovirus que codifiquen per la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b i posteriorment tractats amb medi glucosa 25mM i dexametasona 100nM i Bt_2AMPc 0,3mM durant 3 hores (barres blanques) o 24 hores (barres negres). En tots els casos (A i B)

els valors representen la mitjana \pm S.E.M. de quatre experiments independents. El símbol indica diferències significatives amb $* p < 0,05$ per comparacions amb els extractes d'hepatòcits tractats que sobreexpressaven Bgal.

4.8 Discussió

A fi de comprendre millor el mecanisme pel qual la sobreexpressió de la LGS 2+3b en fetge de rata diabètica STZ causà la disminució en la glicèmia dels animals, en aquest capítol s'estudià si la sobreexpressió de la LGS 2+3b conduïa a canvis compensatoris en l'expressió d'altres proteïnes involucrades en el metabolisme de la glucosa.

Primer es va estudiar si es produïen canvis en l'expressió del gen del transportador GLUT2, la qual es troba augmentada en diabetis, tot i que es corregeix per l'administració d'insulina exògena (Burcelin, Eddouks et al. 1992). Tanmateix, no es detectaren canvis significatius en la quantitat d'ARNm de GLUT2 entre els diferents grups. A més, s'analitzà si es produïen canvis en l'expressió dels gens de la G_L i la PTG, dues subunitats reguladores de la PP1 que en diabetis es troba disminuïda (Doherty, Cadefau et al. 1998; Browne, Delibegovic et al. 2001). Curiosament, l'expressió del gen de la PTG, però no la del de la G_L , es trobava disminuïda en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Aquest resultat podria explicar l'augment en la fosforilació de la GP que observàvem en el fetge d'aquestes rates (*Capítol 3*), doncs la PTG-PP1 a part de funcionar com una fosfatasa de la LGS també funciona com una fosfatasa de la GP, mentre que la G_L -PP1 funcionaria només com fosfatasa de la LGS (Browne, Delibegovic et al. 2001; Green, Aiston et al. 2004).

La disminució en l'abundància d'ARNm de PTG en fetge per sobreexpressió de la LGS 2+3b podria haver estat deguda a un descens de l'expressió del factor de transcripció HNF-3 β (FOXA2), doncs aquest factor transactiva el promotor de la PTG en línies cel·lulars hepàtiques (Cheng, Zhang et al. 2006). La quantitat d'ARNm d'HNF-3 β però no es trobava modificada per la sobreexpressió de la LGS 2+3b en el fetge de les rates STZ. L'HNF-3 β és necessari per a que s'activi el programa gluconeogènic en el fetge en resposta al dejuni, doncs la seva unió al factor de transcripció CREB, que s'activa en resposta a un augment d'AMPc, i al receptor de glucocorticoides (GR) permet que aquests accedeixin a les seves dianes (Zhang, Rubins et al. 2005). Així doncs, com

semblava que l'activitat transcripcional d'HNF-3 β es trobava modificada per sobreexpressió de la LGS 2+3b, es va estudiar si hi havia canvis en la transcripció dels gens dels principals enzims gluconeogènics. El fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b, presentaven una disminució en la quantitat d'ARNm de PEPCK, de G6Pasa i de FBPasa, però no hi havia modificació en la transcripció de Pc. Per tant, a més a més d'un augment en l'emmagatzematge de glicogen hepàtic, un altre dels mecanismes pel qual la sobreexpressió de la LGS 2+3b en el fetge de rates STZ produïa una disminució en la glicèmia era degut a la disminució en l'expressió d'aquests enzims gluconeogènics, el que conduiria segurament a una disminució de la producció de glucosa per part del fetge.

A més, es va analitzar si a part d'una aparent disminució en l'activitat transcripcional del factor HNF-3 β , la sobreexpressió de la LGS 2+3b produïa canvis en d'altres mecanismes que involucren la regulació transcripcional dels enzims gluconeogènics. Primer es va estudiar si hi havia una modificació en l'activació de la quinasa Akt/PKB. L'activació d'aquesta quinasa per insulina condueix a la fosforilació de FOXO1, el que el reté al citoplasma, i a la fosforilació del coactivador transcripcional PGC-1 α , el que impedeix la seva interacció amb els factor FOXO1 i el receptor nuclear HNF-4 α en el nucli (Brunet, Bonni et al. 1999; Li, Monks et al. 2007). Així, tant la fosforilació de FOXO1 com la de la PGC-1 α condueixen a una disminució en l'expressió dels gens de la PEPCK i la G6Pasa (Puigserver, Rhee et al. 2003; Barthel, Schmoll et al. 2005). A part, l'activació de l'Akt/PKB o l'activació dels receptors nuclears LXR (*Liver X-activated receptor*) condueixen a l'augment en l'expressió relativa del factor SREBP-1c (Fleischmann and Iynedjian 2000), que interacciona amb l'HNF-4 α i això impedeix la seva unió al coactivador PGC-1 α , el que suprimeix l'expressió dels gens de la PEPCK, la G6Pasa i la FBPasa (Stulnig, Steffensen et al. 2002; Cao, Liang et al. 2003; Yamamoto, Shimano et al. 2004). La fosforilació d'Akt/PKB, però, no es trobava alterada en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b, i tampoc es trobaren canvis en la transcripció del gen del coactivador PGC-1 α ni la dels factors de transcripció FOXO1 ni SREBP-1c, o del receptor nuclear HNF-4 α . Tot plegat suggereix que el mecanisme pel qual la sobreexpressió de la LGS 2+3b era capaç de reduir l'expressió dels enzims

gluconeogènics era independent de l'activació de la quinasa Akt/PKB, i no implicava cap modificació dels nivells d'expressió dels gens dels principals reguladors transcripcionals de la PEPCK, la G6Pasa i la FBPasa.

Tanmateix l'expressió de l'element de resposta a carbohidrats (ChREBP), es troba incrementada per insulina o glucosa mitjançant l'acció dels receptors LXR (Cha and Repa 2007; Mitro, Mak et al. 2007). L'element de resposta a carbohidrat juga un paper important en la regulació de la transcripció del gen de la G6Pasa, doncs els animals knockout del gen de ChREBP en presenten una disminució (Iizuka, Bruick et al. 2004). La quantitat d'ARNm de ChREBP no es trobava però alterada per la sobreexpressió de la LGS 2+3b en el fetge de les rates STZ. Podem concloure doncs que l'activitat dels receptors LXR no es trobava modificada en el nostre cas, doncs no es detectaren canvis en l'expressió de ChREBP ni en la de SREBP-1c.

El factor de transcripció C/EBP β , que pertany a la família de factors de transcripció que coordinen l'expressió dels gens involucrats en l'homeòstasi de glucosa, juga un paper essencial en la gluconeogènesi hepàtica, i la seva expressió es troba augmentada en el fetge diabètic (Bosch, Sabater et al. 1995; Arizmendi, Liu et al. 1999). Els animals knockout per C/EBP β , en els que s'ha induït diabetis tipus I per injecció d'STZ, presenten una menor expressió dels gens de la PEPCK i la G6Pasa, així com una disminució en la gluconeogènesi i en la glicèmia, doncs aquests animals tenen una producció alterada d'AMPc i una reduïda activitat PKA (Arizmendi, Liu et al. 1999; Liu, Croniger et al. 1999). En el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b hi havia menys quantitat d'ARNm d'aquest factor, el que pot contribuir a explicar la disminució en l'expressió dels gens de la PEPCK i la G6Pasa observada.

L'activitat dels principals reguladors transcripcionals de la PTG, la PEPCK, la G6Pasa i la FBPasa, és a dir de l'HNF-3 β , el FOXO1 i l'HNF-4 α , es pot reprimir per l'acció del receptor nuclear orfe SHP (Kim, Kim et al. 2004; Yamagata, Daitoku et al. 2004). La quantitat d'ARNm d'aquest receptor es trobava augmentada en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b, el que podria explicar les conseqüents reduccions en

l'expressió dels gens anteriorment comentats. Es coneix molt poc de la regulació de l'SHP però alguns estudis han determinat que la seva transcripció pot ésser induïda per múltiples factors (Chanda, Park et al. 2008). Tanmateix, l'activació de la quinasa AMPK, per acció de la metformina, condueix a un augment de l'expressió d'SHP, el que comporta la conseqüent reducció en l'expressió de la PEPCK i la G6Pasa (Kim, Park et al. 2008). L'activació d'aquesta quinasa per acció de la metformina o la leptina, condueix també a la disminució de l'expressió del factor de transcripció C/EBP β en línies cel·lulars hepàtiques i en fetge. Així doncs la reducció de l'expressió d'aquest factor en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b es podria explicar per una activació de l'AMPK (Schroeder-Gloeckler, Rahman et al. 2007). Per tant, un dels mecanismes pels quals la sobreexpressió de la LGS 2+3b podria conduir a un augment en la transcripció del receptor SHP i a la reducció de la de C/EBP β en el fetge de les rates STZ seria mitjançant l'activació de l'AMPK. En fetge de les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b no s'observaren grans canvis en la quantitat de forma fosforilada en la Thr172, i per tant activa de la quinasa, però no es descarta que es puguin produir canvis transitoris en l'activació de l'AMPK, per activació al·lostèrica o inclús per fosforilació, que puguin contribuir als efectes observats per sobreexpressió de la LGS 2+3b en fetge.

L'administració de compostos que inhibeixen la GSK-3 provoca un increment la síntesi de glicogen en el fetge, i la reducció en la producció hepàtica de glucosa (Cline, Johnson et al. 2002). De fet, el tractament de línies cel·lulars hepàtiques amb inhibidors de la GSK-3 produeix una disminució en la transcripció de la PEPCK i la G6Pasa (Bosch, Rodriguez-Gil et al. 1992; Lochhead, Coghlan et al. 2001) per un mecanisme independent de l'activació de la PKB o la inhibició del factor de transcripció FOXO1 (Lochhead, Coghlan et al. 2001). Degut a que un dels majors efectes que presenten aquests compostos és l'augment en la síntesi de glicogen, hom pot especular que la disminució en la transcripció de la PEPCK i la G6Pasa es donaria per un mecanisme semblant al descrit en aquesta tesi doctoral, tot i que no es descarten altres mecanismes.

A part, en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b també observàvem un augment en la fosforilació i per tant activació d'ERK1/2, quinasa que

pertany a la via de les MAPquinases Raf/MEK/ERK1/2. L'activació d'ERK1/2 es produeix en resposta a una gran varietat d'estímuls, i la seva inactivació es produeix per defosforilació per part d'una família de fosfatases d'especificitat dual (MPK). L'activació d'ERK1/2 causa també la inhibició de la transcripció de la PEPCK i la G6Pasa, per un mecanisme desconegut (Gabbay, Sutherland et al. 1996; Schmoll, Grempler et al. 2001). Igualment, trobem descrit que el tractament de la línia cel·lular hepàtica HepG2 amb AICAR, compost farmacològic que indueix l'activació d'AMPK, produeix un increment en la fosforilació de la cascada Raf-1/MEK/ERK1-2/p90^{RSK} (Wang, Mehta et al. 2008).

Finalment, en aquest capítol es mostrà com la sobreexpressió de la LGS 2+3b, en hepatòcits tractats amb dexametasona i Bt₂cAMP, era capaç de reprimir l'expressió dels gens de la PEPCK i la G6Pasa. La sobreexpressió de la forma salvatge de l'enzim, d'una forma catalíticament inactiva, o d'una forma catalíticament inactiva i modificada en els llocs 2 i 3b, no era capaç de produir aquesta disminució en la quantitat d'ARNm dels enzims gluconeogènics. Per tant, l'activitat de l'enzim és clau per a que aquesta repressió es dugui a terme, i no la proteïna LGS en sí. A més, només la sobreexpressió de la LGS 2+3b produïa un augment en l'expressió del receptor nuclear orfe SHP així com a un augment en la fosforilació d'ERK 1/2, el que no ocorria si es sobreexpressava la mateixa quantitat de l'enzim salvatge. Aquests resultats eren semblants als que s'havien obtingut en l'anàlisi del fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Per tant, aquest sistema hepatòcits tractats amb dexametasona i Bt₂cAMP, permetrà aprofundir sobre el mecanisme que opera en els canvis d'expressió gènica deguts a la sobreexpressió de LGS 2+3b en el fetge de les rates STZ.