



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA
I BIOLOGIA MOLECULAR (FARMÀCIA)

**CONTROL DE L'EXPRESSION DEL GEN
GLUCOQUINASA EN FETGE D'*SPARUS*
*AURATA***

Miriam Egea Liria, 2007

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR (FARMÀCIA)

PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOMEDICINA

BIENNI 2000-2002

CONTROL DE L'EXPRESSION DEL GEN GLUCOQUINASA
EN FETGE D'*SPARUS AURATA*

Memòria presentada per Miriam Egea Liria per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona

Directors:

Autora:

Isabel Vázquez Baanante

Isidoro Metón Teijeiro

Miriam Egea Liria

Miriam Egea Liria, 2007.

Allò que valora l'èsser humà no està en el
que sap, sinó en què diu i què fa amb el que sap.
Muñoz Espinalt

“A journey of one thousand miles
begins with a single step”
Confucius

Als meus pares,

Semblava que no arribaria mai el final d'aquesta etapa, però tot arriba... és qüestió de temps. No m'hagués sigut possible si no hagués sigut per l'ajuda de tots vosaltres, que d'una manera o d'una altra m'heu recolzat.

En primer lloc, gràcies a Maribel i a Isidoro. A Maribel por haberme acogido en tu grupo, y por darme la oportunidad de poder realizar este proyecto, gracias por tus consejos y por tu comprensión. Gràcies a Isidoro per ensenyar-me a treballar al laboratori, gràcies per tots els coneixements que m'has transmès al llarg d'aquests anys.

Gràcies als meus companys de laboratori. Gracias a Mari, por todos los momentos que hemos compartido, por los momentos alegres y los no tan alegres, por ser mi compañera de batallas, por tu sinceridad y por tus clases de salsa! Gracias a Diego por tu apoyo cuando lo he necesitado y por tu buen humor; que bueno que viniste... A Ginny, por las veces que me has hecho reír por tu visión particular de las cosas. Gracias a todos aquellos que han pasado por el lab: Judith (per fer-me riure tantes vegades), Sonia (por tu confianza), Andreia, (por tu optimismo y tu alegría), Marionna, Jemina, Gala, Maria del Carmen i María. Gràcies per animar-me sobretot en la recta final.

Gràcies a tots els companys del departament, a la Lucia (uooo, por todo lo que hemos compartido y por apoyarme cuando te he necesitado), al Basu (for your optimism and your hapiness), al Fernando (pels teus bons consells), als veïns de laboratori: al Benjamín, por tus saetas, al Toni, per repetir-me les coses tres vegades, la Marta, pel teu suport moral dels últims mesos, la Vero, l'Albert. Gràcies a tots: Irene, Assia, David, Yolanda, Toni, Chandrum, Lília, Sebastián, Gisela, Vero, Núria M., Eli, Sílvia C, Sílvia P., Alicia, Eva, Laura, David, Laia, Rafa, Cristina, Joana, Laura, Mar, Núria, Xisca (per ser una bona amfitriona) i Cristina M.. Gràcies a tots per fer-me el temps més amè i agradable.

Gràcies a tots els membres del Departament per l'ajuda que he rebut en un moment o altre, per les sortides, pels sopars...gràcies a la M^a Carmen i a la Brugués pel vostre ajut i paciència en els últims mesos.

Gràcies a tots els que me m'heu recolzat durant aquesta etapa fora del departament. A la Laura, que tot i ara estar lluny sempre t'he tingut molt present, gràcies pels teus consells i per demostrar-me que sempre puc comptar amb tu. A la Gemma, Munts, Meri, Ester, Helena, Anna, pels sopars i pel nostre viatge, moltes gràcies pel que hem compartit.

Gràcies a la Leti per escoltar-me, per la teva sinceritat i la teva amicitat, al Ricard, a la Boillos, por nuestras conversas i por nuestras antiguas capoeiradas, i a la Sònia que tot i estar lluny i veure'ns poquet sé que sempre podem trobar el moment de xerrar i explicar-nos les nostres batalles.

A la Anamari, al Xavi, al Jose, al Christian, gracias por estar siempre cerca y por escucharme, gracias por ser geniales, siempre nos quedará la Patagonia... Gracias a la Eva por apoyarme, por nuestras largas conversas, a la Vane, por estar cuando te he necesitado, y en los inicios a Felix, gracias por tu apoyo.

Gracias a Sandra, por estar siempre tan cerca y por ser, a parte de mi hermana, una muy buena amiga. Gracias por tus consejos, por nuestras charlas, por nuestros paseos, por tu apoyo incondicional, podría resumirlo en: gracias por ser como eres.

Gràcies a l'Oriol per escoltar-me, per aconsellar-me, per entendre'm, per animar-me, per fer-me somriure i per la teva paciència en l'últim tram, gràcies per estar a prop meu.

Gracias a mi familia, a mis tíos, a mis yayos que me han ayudado a crecer y a madurar. En especial gracias a mi padre y a mi madre, por vuestro apoyo incondicional, por demostrarme que siempre puedo contar con vosotros, por dárnoslo todo, y por ser como sois.

Gràcies a tots perquè feu que el temps que passa estigui ple de bons moments.

ABREVIATURES

A _{260nm}	absorbància a 260 nm
aa	aminoàcids
Ac	anticòs
ADP	adenosina difosfat
AMP	adenosina monofosfat
AMPc	adenosina monofosfat cíclic
ATP	adenosina trifosfat
atm	atmosferes
bHLH	domini bàsic hèlix-volta-hèlix
Btd	domini <i>Buttonhead</i>
cDNA	àcid desoxiribonucleic complementari
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CIAP	fosfatasa alcalina de vedella
CMV	citomegalovirus
CoA	coenzim A
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding protein</i>
dATP	desoxiadenosina trifosfat
dCTP	desoxicitosina trifosfat
ddNTP	didesoxinucleòtid trifosfat
dGTP	desoxiguanosina trifosfat
DEPC	dietilpirocarbonat
DIG	digoxigenina
DIG ddUTP	dideoxinucleòtids units a DIG
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMF	dimetil fluorur
DMSO	dimetil sulfòxid
DNA	àcid desoxiribonucleic
dNTP	desoxiribonucleòtid trifosfat
dsDNA	DNA doble cadena
DTT	ditiotreitòl
dTTP	desoxitimidina trifosfat
EDTA	àcid etilendiamino tetra acètic
Egr-1	<i>early growth response gene-1</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FCS	sèrum fetal boví
FBP1	fructosa-1,6-bisfosfatasa
Foxo	<i>forkhead box</i>
fru-1P	fructosa-1-fosfat
fru-2,6P ₂	fructosa-2,6-bisfosfat
fru-6P	fructosa-6-fosfat
G6PC	subunitat catalítica de la glucosa-6-fosfatasa
G6PDH	glucosa-6-fosfat deshidrogenasa
GCK	glucoquinasa
GCKA	activadors al·lostèrics de la GCK
GKRP	proteïna reguladora de la GCK

glu-6P	glucosa-6-fosfat
GLUTs	transportadors de glucosa
GTP	guanosina trifosfat
Hepes	4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etansulfat
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
HDAC	histona desacetilasa
HK	hexoquinasa
HMGI-Y	<i>high-mobility group protein family</i>
HNF	factor nuclear hepatocitari
IGF-I	<i>insulin-like growth factor I</i>
IgG	immunoglobulina G
Insig	<i>Insulin-induced gene</i>
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranòsid
IRS	substrat del receptor de la insulina
kb	kilobase
kcal	kilocaloria
kDa	kilodalton
K_m	constant de Michaelis-Menten
KLF	<i>Krüppel-like factors</i>
LB	medi de cultiu Luria-Bertrani
Luc	gen de la luciferasa de <i>Photinus pyralis</i>
LXR	receptor hepàtic X
mA	miliamperi
MEM	medi mínim essencial
MES	àcid 2-[N-morfolino]etansulfònic
MODY 2	<i>maturity-onset diabetes of the young type 2</i>
MOPS	àcid 3-[N-morfolino] propansulfònic
mRNA	àcid ribonucleic missatger
MS-222	metansulfonat de l'àcid m-aminobenzoïc etil éster
NAD	nicotinamida-adenina-dinucleòtid
NADH	nicotinamida-adenina-dinucleòtid reduït
NADP	nicotinamida-adenina-dinucleòtid fosfat
NES	senyal d'exportació nuclear
NF	factor nuclear
NLS	senyal de localització nuclear
NO	òxid nítric
Oct	motiu octàmer
OD	densitat òptica
oligo	oligonucleòtid
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactopiranòsid
p β PCCasa	subunitat β de propionil-CoA carboxilasa
Pals	seqüències palindròmiques
pb	parells de bases
PBS	tampó fosfat salí
PC	piruvat carboxilasa
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
Pdx-1	<i>pancreas/duodenum homeobox-1</i>
PEG	polietilenglicol
PEP	fosfoenol piruvat

PEPCK	fosfoenol piruvat carboxiquinasa
PFK	6-fosfofructo-1-quinasa
PFKFB1	6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa
PGC-1	<i>PPARγcoactivator factor-1</i>
Pi	fosfat inorgànic
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
PK	piruvat quinasa
PKA	proteïna quinasa depenent d'AMPc
PKC	proteïna quinasa C
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorur
PNK	polinucleòtid quinasa
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE	element de resposta a receptors activats per proliferadors de peroxisomes
PPi	pirofosfat inorgànic
PPI-PFK	6-fosfofructo-1-quinasa depenent de pirofosfat inorgànic
RACE	amplificació ràpida d'extrem de cDNA
RNA	àcid ribonucleic
RNAsa	ribonucleasa
RT	transcriptasa reversa o retrotranscriptasa
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
S1P	<i>protease site-1</i>
S _{0,5}	concentració de substrat a la qual l'enzim mostra $V_{\max}/2$
SCAP	<i>SREBP cleavage activating protein</i>
SDS	dodecil sulfat sòdic
SDS-PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida i SDS
SIF-1	<i>Sp3 interacting factor</i>
SRE	element de resposta a esterols
SREBP	<i>sterol-regulatory element-binding protein</i>
SSC	solució salí-citrat sòdic
Sp	<i>specificity protein</i>
Stat	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
SV40	Virus 40 de simi
T3	3,3',5-Triiodetironina
TAE	Tris-acetat-EDTA
TBE	Tris-borat-EDTA
TBP	proteïna que s'uneix a la caixa TATA
TdT	desoxi-nucleotidil transferasa terminal
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N, N, N', N'-tetrametiletildiamina</i>
Tm	<i>melting temperature</i>
TNF	factor de necrosi tumoral
Tnt	transcripció i traducció <i>in vitro</i>
Tris	tris(hidroximetil)aminometà
U	Unitat
UPE	<i>upstream promoter element</i>
USF	<i>upstream stimulatory factor</i>
UTR	regió no traduïda
UV	ultraviolat
V	Volt

$V_{\text{màx}}$
Wt
X-gal

velocitat màxima de reacció
wild type
5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranòsid

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1. HOMEÒSTASI DE LA GLUCOSA.....	3
1.1.1. METABOLISME DE CARBOHIDRATS EN PEIXOS	5
1.2. GLUCOQUINASA	8
1.2.1. CARACTERÍSTIQUES CINÈTIQUES	10
1.2.2. ESTRUCTURA DEL GEN <i>GCK</i>	11
1.2.3. AMINOÀCIDS CLAU PER A L'ACTIVITAT <i>GCK</i>	13
1.2.3.A. Aminoàcids implicats en la unió a substrats: glucosa i ATP.....	13
1.2.3.B. Aminoàcids implicats en la unió a la <i>GKRP</i>	14
1.2.3.C. Mutacions de <i>GCK</i> relacionades amb desordres en la glucèmia.....	14
1.2.4. PROMOTOR DE LA <i>GCK</i>	15
1.2.5. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA	16
1.2.5.A. Regulació per factors de transcripció	16
1.2.5.B. Regulació nutricional i hormonal de la <i>GCK</i>	18
1.2.5.C. Influència del glucagó i dels derivats de l'AMPc.....	20
1.2.5.D. Influència d'altres factors	20
1.2.6. REGULACIÓ POST-TRADUCCIONAL I DE L'ACTIVITAT DE LA <i>GCK</i>	21
1.2.6.A. Proteïna reguladora de la <i>GCK</i> (<i>GKRP</i>)	21
1.2.6.A.1. Patró d'expressió	22
1.2.6.A.2. Funcions de la proteïna reguladora de la <i>GCK</i>	23
1.2.6.B. Àcids grassos de cadena llarga	25
1.2.6.C. Inhibició de l'activitat <i>GCK</i> per <i>N</i> -acetilglucosamina	26
1.2.6.D. Activadors al·lostèrics de la <i>GCK</i>	26
1.2.6.E. Unió a altres proteïnes i orgànuls cel·lulars.....	27
1.2.7. EFECTES METABÒLICS DE LA SOBREEXPRESSIÓ I DE LA SUPRESSIÓ DEL GEN <i>GCK</i>	28
1.2.7.A. Sobreexpressió de <i>GCK</i>	28
1.2.7.A.1. Sobreexpressió de <i>GCK</i> a fetge.....	29
1.2.7.A.2. Sobreexpressió de <i>GCK</i> a pàncrees	29
1.2.7.B. Supressió de <i>GCK</i>	30
1.2.7.B.1. Supressió de <i>GCK</i> a fetge.....	30
1.2.7.B.2. Supressió de <i>GCK</i> a pàncrees	30
1.3. PROTEÏNES Sp1-LIKE O KRÜPPEL-LIKE FACTORS (KLFS).....	31
1.3.1. FAMÍLIA DE PROTEÏNES Sp	32
1.3.1.A. Sp1	33
1.3.1.A.1. Estructura.....	33
1.3.1.A.2. Anàlisi funcional	33
1.3.1.A.3. Regulació d'Sp1	34
1.3.1.B. Sp2	37
1.3.1.C. Sp3	37
1.3.1.C.1. Estructura.....	37

1.3.1.C.2. Anàlisi funcional.....	38
1.3.1.D. Sp4.....	39
1.3.1.E. Regulació a través de la relació Sp1/Sp3.....	39
1.4. FAMÍLIA SREBP	40
1.4.1. ESTRUCTURA.....	40
1.4.2. ISOFORMES CODIFICADES PER SREBP-1	41
1.4.3. ISOFORMES CODIFICADES PER SREBP-2	42
1.4.4. PROCÉS DE MADURACIÓ DELS SREBP.....	42
1.4.5. ANÀLISI FUNCIONAL.....	43
1.5. 6-FOSFOFRUCTO-2-QUINASA/FRUCTOSA-2,6-BIFOSFATASA	45
1.5.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS	45
1.5.2. REGULACIÓ DE L'EXPRESSION DE LA PFKB1.....	46
2. MATERIALS I MÈTODES	49
2.1. MATERIALS	51
2.1.1. ANIMALS UTILITZATS EN L'EXPERIMENTACIÓ.....	51
2.1.1.A. Manipulació dels peixos i presa de mostres	51
2.1.1.A.1. Efecte de l'estat nutricional	52
2.1.1.A.2. Efecte d'insulina i glucosa.....	52
2.1.2. SOQUES D' <i>ESCHERICHIA COLI</i> UTILITZADES.....	53
2.1.3. CULTIUS CEL·LULARS	53
2.1.3.A. Línies cel·lulars utilitzades	53
2.1.3.B. Medis i reactius emprats	53
2.1.4. PLASMIDIS.....	54
2.1.4.A. Plasmidis d'expressió en eucariotes	54
2.1.4.B. Vectors reporters.....	54
2.1.4.C. Altres	54
2.1.5. OLIGONUCLEÒTIDS	54
2.1.5.A. Oligonucleòtids utilitzats per amplificar fragments de GCK d'orada per PCR	54
2.1.5.B. Oligonucleòtids utilitzats per amplificar fragments del cDNA de GCK de rata per PCR.....	55
2.1.5.C. Oligonucleòtids utilitzats en els assajos de retardació en gel.....	56
2.1.5.D. Oligonucleòtids proveïts per kits comercials.....	56
2.1.5.E. Oligonucleòtids de vectors	56
2.1.5.F. Oligonucleòtids utilitzats per amplificar un fragment de β -actina d'orada per PCR	57
2.1.6. ANTICOSSOS UTILITZATS	57
2.1.6.A. Anticossos utilitzats per als assajos de <i>Western blot</i> i per a la immunoprecipitació de cromatina.....	57
2.1.6.B. Anticossos utilitzats pels assajos de súper retardació.....	57

2.2. MÈTODES	57
2.2.1. TÈCNIQUES GENERALS DE BIOLOGIA MOLECULAR	57
2.2.1.A. Electroforesi de DNA	58
2.2.1.A.1. Purificació de fragments de DNA a partir del gel d'agarosa.....	59
2.2.1.B. Modificació enzimàtica del DNA.....	59
2.2.1.B.1. Digestió enzimàtica	59
2.2.1.B.2. Defosforilació de DNA.....	59
2.2.1.B.3. Fosforilació del DNA	59
2.2.1.B.4. Conversió d'extrems protuberants en roms	60
2.2.1.C. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	61
2.2.1.C.1. Purificació de productes de PCR	61
2.2.1.D. Tècnica del passeig cromosòmic	62
2.2.1.E. Clonatge i lligació de fragments de DNA	63
2.2.1.F. Transformació de cèl·lules competents	63
2.2.1.F.1. Obtenció de cèl·lules d' <i>E.coli</i> competents	63
2.2.1.F.2. Transformació per xoc tèrmic	64
2.2.1.G. PCR preps	65
2.2.1.H. Obtenció de DNA plasmídic.....	65
2.2.1.H.1. Minipreps.....	66
2.2.1.H.2. Midipreps i Maxipreps	66
2.2.1.I. Seqüenciació del DNA	67
2.2.1.J. Anàlisi informàtica i introducció de seqüències en bases de dades	67
2.2.1.K. Tècnica d'RT-PCR	67
2.2.2. SMART RACE 5' cDNA AMPLIFICACION KIT	68
2.2.2.A. Disseny d'oligonucleòtids	69
2.2.2.B. Síntesi de la primera cadena de cDNA.....	70
2.2.2.C. Purificació del cDNA	70
2.2.2.D. Amplificació 5' RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>).....	70
2.2.3. TRANSCRIPCIÓ/TRADUCCIÓ <i>IN VITRO</i>	71
2.2.4. <i>NORTHERN BLOT</i>	72
2.2.4.A. Aïllament d'RNA	72
2.2.4.B. Electroforesi d'RNA.....	72
2.2.4.B.1. Preparació de les mostres.....	73
2.2.4.B.2. Preparació del gel	73
2.2.4.C. Transferència i fixació de l'RNA a membranes de niló	73
2.2.4.D. Marcatge de les sondes	74
2.2.4.D.1. Síntesi de la sonda	74
2.2.4.D.2. Purificació de la sonda.....	75
2.2.4.E. <i>Dot blot</i>	75
2.2.4.F. Prehibridació, hibridació i rentats dels filtres amb l'RNA fixat.....	75
2.2.4.F.1. Prehibridació	75
2.2.4.F.2. Hibridació i rentats.....	76
2.2.4.G. Immunodetecció, exposició i revelat	76
2.2.4.H. Sondes utilitzades	77
2.2.5. <i>WESTERN BLOT</i>	77
2.2.5.A. Obtenció d'extractes crus de teixit hepàtic.....	77
2.2.5.B. Quantificació de proteïnes: mètode de <i>Bradford</i>	78

2.2.5.C. Electroforesi de proteïnes	78
2.2.5.C.1. Preparació de les mostres.....	78
2.2.5.C.2. Preparació de gels de poliacrilamida	79
2.2.5.C.3. Procés electroforètic	79
2.2.5.D. Transferència de proteïnes a membrana	80
2.2.5.E. Tinció de proteïnes amb blau de <i>Coomassie</i>	80
2.2.5.F. Immunodetecció	81
2.2.6. ASSAIG DE RETARDACIÓ EN GEL (UNIÓ DNA-PROTEÏNA).....	82
2.2.6.A. Obtenció d'extractes nuclears a partir de cèl·lules en cultiu	82
2.2.6.B. Preparació d'oligonucleòtids marcats.....	82
2.2.6.B.1. Obtenció d'oligonucleòtids de doble cadena	82
2.2.6.B.2. Marcatge de fragments de DNA amb DIG-ddUTP	83
2.2.6.C. Electroforesi.....	83
2.2.6.C.1. Preparació de gels de poliacrilamida	83
2.2.6.C.2. Reacció d'unió proteïna-DNA marcat	84
2.2.6.C.3. Assaig electroforètic	84
2.2.6.D. Transferència i fixació a la membrana.....	85
2.2.6.E. Immunodetecció	85
2.2.6.F. Experiments de competició	85
2.2.6.G. Experiments de súper retardació.....	85
2.2.7. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA (<i>ChIP</i>).....	85
2.2.7.A. Aïllament de la cromatina i entrecreuament.....	86
2.2.7.B. Preparació del control amb càrrega de DNA total (unit més no unit; <i>input</i>)....	86
2.2.7.C. Immunoprecipitació	86
2.2.7.D. Preparació d'esperma de salmó	88
2.2.7.D.1. Fragmentació del DNA.....	88
2.2.7.D.2. Purificació de l'esperma de salmó.....	88
2.2.7.D.3. Precipitació del DNA	88
2.2.7.E. Anàlisi del DNA immunoprecipitat.....	88
2.2.8. CULTIUS DE LÍNIES CEL·LULARS EUCARIOTES I TRANSFECCIONS	89
2.2.8.A. Condicions i tècniques generals	89
2.2.8.A.1. Arrancada del cultiu cel·lular	89
2.2.8.A.2. Manteniment dels cultius cel·lulars: tripsinització	89
2.2.8.A.3. Congelació de cèl·lules	90
2.2.8.B. Transfecció transitòria de cèl·lules	90
2.2.8.B.1. Transfecció mitjançant el mètode del fosfat càlcic.....	91
2.2.8.B.2. Transfecció facilitada per embolcalls lipídics	92
2.2.8.B.3. Anàlisi de l'activitat transcripcional	92
2.2.8.C. Fixació de cèl·lules i immunodetecció	94
2.2.9. CONSTRUCCIÓ DE PLASMIDIS REPORTERS AMB DIFERENTS FRAGMENTES DEL PROMOTOR DE GCK DE FETGE D'ORADA.....	94
2.2.9.A. Constructe pGK606	95
2.2.9.B. Constructe pGK1321	95
2.2.9.C. Constructes pGK288 i pGK21	95
2.2.9.D. Constructes pGK72 i pGK72mutSp1	95
2.2.9.E. Constructes pGK105, pGK105mutSRE	96
2.2.9.F. Constructe pGK606Δ288-21	96

2.2.9.G. Construcció d'un plasmidi reporter amb el promotor de GCK de fetge de rata (prGK1418)	96
2.2.10. CONSTRUCCIÓ DELS PLASMIDIS QUE CODIFIQUEN PER A LA PROTEÏNA DE FUSIÓ GFP-GCK	97
2.2.11. ANÀLISI ESTADÍSTIC DE LES DADES	97
3. RESULTATS	101
3.1. EFECTE DE LA GLUCOSA I LA INSULINA SOBRE L'EXPRESSIÓ DE GCK ...	101
3.2. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE GCK EN DIFERENTS TEIXITS	102
3.3. DETERMINACIÓ DE L'INICI DE TRADUCCIÓ	103
3.4. LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LA GCK.....	106
3.4.1. LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE GCK EN CONDICIONS DE BAIXA CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA	107
3.4.2. LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE GCK A ALTA CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA:.....	108
3.5. CLONATGE DEL PROMOTOR DE LA GCK D'ORADA.....	110
3.6. DETERMINACIÓ DE L'INICI DE TRANSCRIPCIÓ.....	112
3.7. FUNCIONALITAT DEL PROMOTOR DE LA GCK D'ORADA	113
3.8. PAPER D'SREBP-1a EN LA REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DE GCK	116
3.8.1. ACTIVACIÓ DEL PROMOTOR DE GCK PER SREBP-1a.....	116
3.8.2. SREBP-1a S'UNEIX A LA CAIXA SRE -105/-95.....	117
3.8.3. LA MUTACIÓ DE LA CAIXA SRE ELIMINA LA TRANSACTIVACIÓ PRODUÏDA PER SREBP-1a.....	119
3.9. EFECTE D'SREBP-1a SOBRE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DE PFKFB1 D'ORADA	120
3.10. REGULACIÓ HORMONAL I NUTRICIONAL D'SREBP-1	124
3.11. PAPER D'Sp1 I Sp3 EN LA REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE GCK D'ORADA	125
3.11.1. TRANSACTIVACIÓ DEL PROMOTOR DE GCK PER Sp1 I REPRESSIÓ PER Sp3 DE L'ACTIVACIÓ PRODUÏDA PER Sp1	125
3.11.2. Sp1 I Sp3 S'UNEIXEN <i>IN VITRO</i> I <i>IN VIVO</i> A LA CAIXA GC -53/44.....	128
3.11.3. LA MUTACIÓ DEL LLOC D'UNIÓ D'Sp ELIMINA LA TRANSACTIVACIÓ PRODUÏDA PER Sp1.....	132
3.12. EFECTE DE LA INSULINA EN L'EXPRESSIÓ D'Sp1 I Sp3 EN FETGE D'ORADA	133
3.13. MODULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE LA GCK EN PRESENCIA D'Sp1 I SREBP-1a.....	133

3.14. EFECTE DE LA INSULINA SOBRE L'ACTIVITAT PROMOTORA DE <i>GCK</i>	134
3.14.1. PAPER D'Sp1 I SREBP-1a EN L'ACTIVACIÓ DE <i>GCK</i> DEPENDENT D'INSULINA.....	135
4. DISCUSSIÓ	139
4.1. REGULACIÓ DE L'EXPRESSION DE <i>GCK</i> PER GLUCOSA I INSULINA EN FETGE D'ORADA	141
4.2. REGULACIÓ DE LA <i>GCK</i> HEPÀTICA D'ORADA PER LA <i>GKRP</i>	142
4.3. CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DEL PROMOTOR DE <i>GCK</i> D'ORADA.....	145
4.4. PAPER D'SREBP-1a EN LA REGULACIÓ DE <i>GCK</i>	148
4.5. PAPER D'Sp1 I Sp3 EN LA REGULACIÓ DE LA <i>GCK</i>	150
4.6. PAPER D'Sp1 I SREBP EN L'ACTIVACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE LA <i>GCK</i> A TRAVÉS D'INSULINA	152
5. CONCLUSIONS	157
6. BIBLIOGRAFIA	159
ANNEX: LLISTAT DE PUBLICACIONS	197

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS:

El metabolisme dels peixos carnívors està adaptat a la utilització d'elevades quantitats de proteïna, component essencial de la seva dieta natural. En canvi, aquests animals presenten baixa capacitat per utilitzar els carbohidrats de la dieta. Aquesta característica metabòlica es reflecteix en la perllongada hiperglicèmia postprandial que s'observa quan els peixos carnívors són alimentats amb dietes riques en carbohidrats o se'ls subministra glucosa.

Un dels principals objectius per incrementar la producció de peixos en cultiu és millorar la utilització dels carbohidrats, ja que dietes d'elevat contingut en proteïna incrementen el cost de producció i condueixen a problemes ecològics; l'alliberament, junt amb les excretes, d'elevades quantitats d'amoni condueixen a l'eutrofització de les aigües. D'altra banda, la necessitat de proteïnes per a la preparació de dietes està produint a nivell global una creixent esquilmació d'espècies d'origen marí.

El perfil metabòlic dels peixos en ser alimentats amb dietes d'elevat contingut en carbohidrats, reflexa un comportament similar a l'observat en rates diabètiques. La intolerància relativa a la glucosa converteix als peixos carnívors en un nou model per a l'estudi de les bases moleculars de la diabetis de tipus 2.

L'enzim glucoquinasa (GCK) és essencial per al manteniment de l'homeòstasi de la glucosa. La GCK participa en la primera reacció de la glucòlisi fosforilant la glucosa a glucosa-6P i regula així, un dels cicles substrat clau de la glucòlisi/gluconeogènesi. Una de les hipòtesis que s'havia suggerit per explicar la baixa utilització de glucosa pels peixos carnívors era l'absència d'activitat GCK en fetge. El clonatge i expressió del cDNA que codifica per a la GCK de fetge d'orada (*Sparus aurata*) ha permès demostrar la seva existència i funcionalitat en peixos carnívors. Estudis recents han demostrat que l'expressió de la GCK hepàtica d'orada i d'altres espècies de peixos està regulada en funció de les condicions nutricionals, tals com estats de dejuni-alimentació, restricció energètica, composició de la dieta o regulació postprandial. Aquests estudis descarten, per tant, l'absència de regulació de l'expressió de la GCK en fetge de peixos com a causa de la intolerància d'aquests animals a la glucosa.

En aquest context i per aprofundir en el coneixement de les bases moleculars que regulen el metabolisme de carbohidrats en peixos carnívors, ens vam plantejar estudiar la regulació de l'expressió del gen GCK en fetge d'orada. Específicament, ens vam proposar clonar i caracteritzar el promotor d'aquest gen. Mitjançant experiments de transfecció transitòria i assajos de retardació en gel, hem determinat que els factors de transcripció SREBP-1a, Sp1 i Sp3 estan implicats en la regulació transcripcional de *GCK*.

Els nostres resultats mostren que SREBP-1a és un factor de transcripció que pot ser important en l'activació transcripcional de gens que codifiquen per a enzims clau en el metabolisme de carbohidrats. A més de l'efecte activador sobre la transcripció de la *GCK* hepàtica d'orada, hem observat que SREBP-1a també transactiva el promotor d'un altre

enzim clau en la glucòlisi-gluconeogènesi en fetge d'orada, la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB1).

D'altra banda, ens vam proposar esclarir els processos moleculars que condueixen a l'activació transcripcional del gen *GCK* per insulina. Específicament, el factor de transcripció Sp1 apareix com a mediador de l'efecte activador de la insulina sobre l'expressió de la *GCK* hepàtica d'orada.

Adicionalment, els nostres resultats suggereixen que la localització subcel·lular de la *GCK* hepàtica d'orada podria estar regulada per una proteïna homòloga a la proteïna reguladora de la *GCK* (GKRP) de mamífers.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. HOMEÒSTASI DE LA GLUCOSA

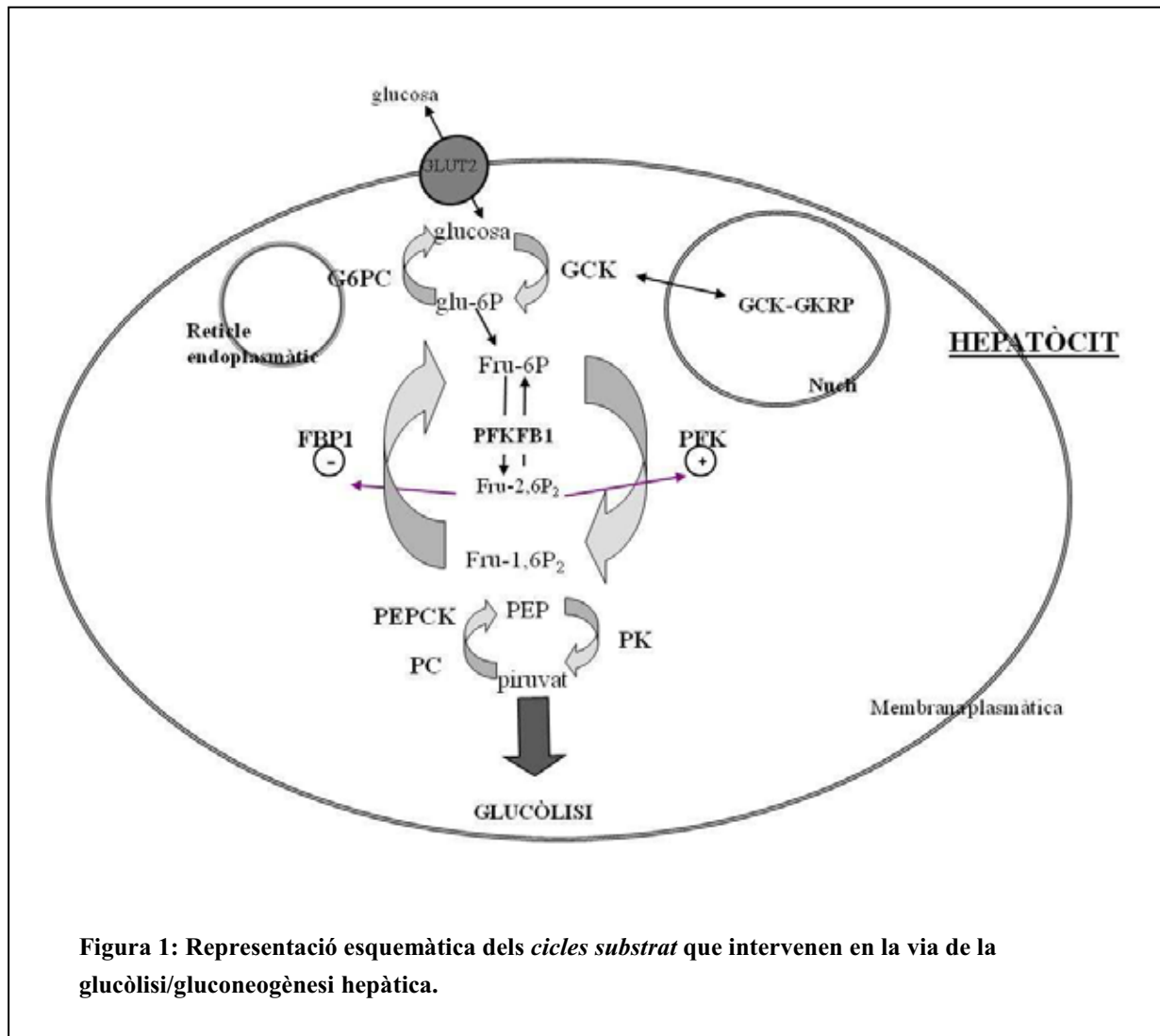
En mamífers, la glucosa és un nutrient essencial per a la majoria de cèl·lules, per aquesta raó el seu nivell en sang està sotmès a un control precís i estricte. L'homeòstasi de la glucosa es manté independentment de què els canvis metabòlics derivin cap al consum o emmagatzematge d'energia. Un complex sistema homeostàtic, en el que estan implicats: fetge, pàncrees, múscul i teixit adipós, permet mantenir la glucèmia mitjançant l'actuació de diferents processos, entre els que podem destacar: l'absorció intestinal dels carbohidrats de la dieta; la utilització de glucosa per teixits perifèrics; la pèrdua de glucosa a través dels túbuls renals; i la recaptació i alliberació de la glucosa al torrent sanguini promoguda pel fetge. El fetge presenta, per tant, un paper essencial en el manteniment de la glucèmia.

En períodes postprandials, l'excés de glucosa provinent de la dieta s'emmagatzema en el fetge en forma de glicogen i en part com a lípids. Quan els nivells de glucosa en sang són elevats, les cèl·lules β -pancreàtiques secreten insulina, què condueix a la utilització de glucosa pels teixits perifèrics i suprimeix la producció hepàtica de glucosa. Paral·lelament, la insulina promou l'emmagatzemament d'energia induint la síntesi de glicogen i àcids grassos. Quan els nivells de glucèmia són baixos es promou una supressió de la secreció d'insulina. Les cèl·lules α -pancreàtiques alliberen glucagó, què condueix a un augment de producció hepàtica de glucosa, mitjançant la inducció de la glicogenolisi i la gluconeogènesi. En aquestes circumstàncies, l'entrada de glucosa al múscul i al fetge disminueix, i la principal font d'energia d'aquests òrgans passen a ser els àcids grassos (Nordlie i col·l, 1999).

La recaptació o producció de glucosa pel fetge està controlada per dues vies metabòliques, la glucòlisi i la gluconeogènesi. La glucòlisi consisteix en un conjunt de reaccions acoblades que converteixen la glucosa en piruvat, i generen energia en forma d'ATP. En contraposició, la gluconeogènesi és una via metabòlica que permet la síntesi de glucosa a partir de precursors, com piruvat, lactat, glicerol, metabòlits intermediaris del cicle de Krebs o del catabolisme dels aminoàcids. La modulació del flux en el sentit de glucòlisi o gluconeogènesi s'aconsegueix pel control específic d'enzims reguladors que estan implicats en les tres etapes no reversibles d'aquestes vies. Aquestes tres etapes són punts claus de control i són anomenades *cicles substrat* (figura 1). Els cicles substrat són regulats de forma específica i coordinada, de manera que són decisius per mantenir l'homeòstasi de la glucosa i minimitzar les pèrdues d'energia.

Considerant el flux metabòlic en sentit de gluconeogènesi, el primer cicle substrat està regulat per l'enzim glucolític piruvat quinasa (PK), responsable del pas de fosfoenolpiruvat a piruvat, i pels enzims gluconeogènics piruvat carboxilasa (PC) i fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK), què catalitzen la formació de fosfoenolpiruvat.

En el següent *cicle substrat* intervenen conjuntament la 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK) en la via glucolítica i la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBP1) en la via gluconeogènica. La fructosa-2,6P₂ (fru-2,6P₂), potent activador al·lostèric de PFK i inhibidor de FBP1, actua com a un important estimulador glucolític i inhibidor gluconeogènic. La síntesi i degradació de fru-2,6P₂ tenen lloc per la intervenció d'un enzim bifuncional, la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB1; EC 2.7.1.105/ 3.1.3.46) (Darville i col·l, 1987; Lively i col·l, 1988; Wu i col·l, 2001, 2002, 2004, 2006).



El darrer *cicle substrat* que participa en la regulació metabòlica de la glucòlisi/gluconeogènesi implica la interconversió entre glucosa i glucosa-6P (glu-6P). La glucoquinasa (GCK; EC 2.7.1.2) catalitza la fosforilació de la glucosa donant lloc a la primera reacció de la glucòlisi, mentre que la glucosa-6-fosfatasa (G6PC) intervé en l'etapa terminal de la gluconeogènesi i de la glucogenolisi, promovent la desfosforilació de glu-6P a glucosa.

En mamífers, l'activitat d'aquests enzims està regulada atenent a les condicions energètiques, genètiques, nutricionals i hormonals de l'organisme (Nordlie i col·l, 1999; Van de Werve i col·l, 2000; McVie-Wylie i col·l, 2001). En situacions de dejú i diabetis s'observa una disminució de l'expressió gènica de *GCK*, *PFK1* i *PK* en fetge de mamífers, mentre que la realimentació o l'administració d'insulina promouen els efectes oposats (Dunaway i col·l, 1978; Iynedjian i col·l, 1987; Pilkis i col·l, 1991). D'altra banda, en estats de dejuni i diabetis l'expressió dels enzims hepàtics *G6PC*, *PEPCK* i *FBP1* es troba incrementada en mamífers. Aquests increments es contraresten per la realimentació o per l'administració d'insulina (El-Maghrabi i col·l, 1991; Pilkis i col·l, 1991; Argaud i col·l, 1996).

1.1.1. METABOLISME DE CARBOHIDRATS EN PEIXOS

Generalment, els peixos carnívors presenten baixa capacitat per mantenir la glucèmia i per metabolitzar carbohidrats (Christiansen i col·l, 1987, Cowey i col·l, 1989, Wilson R.P., 1994). L'elevat percentatge de proteïnes i la baixa quantitat de carbohidrats presents en la seva dieta natural fa dels aminoàcids els principals substrats gluconeogènics destinats a la síntesi *de novo* de glucosa i de glicogen. La dieta proteica i la baixa demanda energètica dels peixos, poden contribuir a la baixa utilització dels carbohidrats com a font d'energia per part d'aquests organismes (Cowey i Walton, 1989; Baanante i col·l, 1991; Wilson R.P, 1994; Moon i Foster, 1995).

La baixa capacitat dels peixos carnívors per metabolitzar carbohidrats queda reflectida en les proves de tolerància a glucosa que condueixen, en aquests organismes, a estats d'hiperglicèmia més marcats i sostinguts que els descrits per a mamífers (Palmer i Ryman, 1972). En truita, l'administració oral de glucosa o dietes d'elevat contingut en carbohidrats dóna lloc a hiperglicèmia i hiperinsulinèmia postprandial (Baños i col·l, 1998; Legate i col·l, 2001; Moon T.W., 2001). Els símptomes postprandials que caracteritzen la diabetis tipus 2 en humans són similars al perfil metabòlic que s'observa en peixos carnívors quan s'alimenten amb dietes d'elevat contingut en carbohidrats, o després de l'administració oral de glucosa. Aquesta semblança fa que els peixos carnívors siguin un nou model per l'estudi de les bases moleculars de la diabetis tipus 2.

D'altra banda, els peixos passen llargs períodes de dejuni relacionats amb les èpoques de migració o de reproducció. A diferència del que s'ha observat en mamífers, els nivells de glucogen hepàtic es mantenen elevats en peixos després de períodes llargs de dejuni. Malgrat que la mobilització de glucogen varia entre les diferents espècies de peixos, la seva degradació no sembla constituir una via important en el manteniment de la glucèmia, essent necessaris períodes més llargs que en mamífers per observar un descens significatiu dels nivells de glucogen hepàtic en aquests organismes (Nagai i col·l, 1971; Larsson i col·l, 1973; French i col·l, 1983; García de Frutos i col·l, 1990; Hemre i col·l, 1990). La intolerància relativa a la glucosa (Cowey i Walton, 1989) sembla estar relacionada doncs, amb la

utilització preferent de lípids i proteïnes en lloc de glucogen com a font d'energia per part dels peixos en condicions de dejuni.

La funcionalitat d'alguns enzims que participen en el metabolisme dels carbohidrats, com PFK, FBP1, PK, PFKFB1, G6PC, GCK s'ha posat de manifest en peixos. És més, l'activitat d'aquests enzims està modulada en funció de l'estat nutricional (Morata i col·l, 1982; Fideu i col·l, 1983; Lupiáñez i col·l, 1989; Bonamusa i col·l, 1992; Suárez i col·l, 1995; Metón i col·l, 1999a, 1999b, 2000; Caseras i col·l, 2000, 2002; Capilla i col·l, 2003; Kirchner i col·l, 2003, 2005).

Com en rata, les activitats PFK i PK hepàtiques d'orada (*Sparus aurata*) disminueixen en situacions de dejuni i es recuperen com a conseqüència de la realimentació (Bonamusa i col·l, 1992; Metón i col·l, 1999b). L'expressió de la PFKFB1 d'orada descendeix també en condicions de dejuni, per recuperar-se després de la realimentació (Metón i col·l, 1999a). Pel contrari, situacions de dejuni condueixen a un increment en l'activitat G6PC a fetge d'orada (Caseras i col·l, 2002) i truita (Morata i col·l, 1982), però no sembla modificar-se en carpa (Shikata i col·l, 1993; Shimeno i col·l, 1997).

El clonatge de la G6PC de peixos (Nagl i col·l, 1999; Caseras i col·l, 2002) ha permès analitzar l'expressió d'aquest gen en diferents condicions nutricionals. L'expressió està incrementada en estats de dejú i restricció energètica, mentre que situacions postpandrials promouen un descens en els nivells de missatger. Aquesta regulació és oposada amb la de GCK en fetge d'orada (Caseras i col·l, 2000, 2002; Metón i col·l, 2004).

D'altra banda, dietes amb un alt contingut en carbohidrats i baix contingut en proteïnes promouen l'increment en les activitats enzimàtiques PFK i PK a fetge d'orada en cultiu (Metón i col·l, 1999b). L'activitat PK d'*Anguilla anguilla* també s'estimula per l'administració de dietes riques en carbohidrats (Suárez i col·l, 1995). Dietes d'elevat contingut en carbohidrats i baix contingut en lípids promouen un descens en l'activitat G6PC hepàtica en l'espècie carnívora *Seriola quinqueradiata* (Shimeno i col·l, 1996) i en l'espècie omnívora *Oreochromis niloticus* (Shimeno i col·l, 1993). En canvi, quantitats elevades de carbohidrats en la dieta no afecten a la modulació de l'expressió de G6PC en fetge d'orada i truita (Panserat i col·l, 2000b; Caseras i col·l, 2002). S'ha observat que quantitats creixents de dieta promouen un increment en les activitats PFK i PK a fetge d'orada, així com una disminució en l'activitat FBP1 (Metón i col·l, 1999b). L'expressió de la PFKFB1 hepàtica d'orada, tant a nivell d'mRNA com d'activitat, està estimulada de manera directament proporcional per la quantitat de dieta i el contingut de carbohidrats de la dieta (Metón i col·l, 2000a).

Generalment, l'escassa regulació de la glucèmia observada en peixos carnívors ha estat atribuïda a la baixa capacitat que presenten aquests organismes per fosforilar glucosa, i a l'absència de l'enzim GCK (Christiansen i col·l, 1987; Cowey i Walton, 1989; Wilson R.P, 1994). De fet, la baixa regulació de l'expressió dels enzims hepàtics que controlen el flux entre glucosa/glu-6P havia estat considerat per diversos autors un dels factors clau per explicar la baixa capacitat dels peixos per metabolitzar la glucosa (Cowey i col·l, 1989; Wilson R.P., 1994).

Cowey i col·l (1977) no van apreciar canvis d'activitat hexoquinasa (HK) i tampoc van poder detectar activitat GCK a fetge de truites alimentades amb dietes de diferent contingut en carbohidrats. No obstant això, en estudis posteriors es van observar canvis en la fosforilació hepàtica de glucosa com a conseqüència de l'administració d'una dieta rica en carbohidrats (Fideu i col·l, 1983). Borrebaek i col·l (1993) van detectar nivells molt baixos d'una activitat de tipus GCK a fetge de salmó. A fetge d'aquesta espècie ha estat caracteritzada una proteïna de 51 kDa amb activitat HK, amb baixa afinitat per la glucosa, que resulta inhibida per *N*-acetilglucosamina i que presenta, per tant, característiques similars a les observades per a la GCK de rata (Tranulis i col·l, 1996). En fetge de perques, alimentades amb dieta d'elevat contingut en carbohidrats, es va detectar una activitat enzimàtica de baixa capacitat per fosforilar glucosa, similar a la descrita per GCK de mamífers (Borrebaek i col·l, 2000).

Recentment, s'ha clonat el cDNA que codifica per a la GCK hepàtica en peixos (Caseras i col·l, 2000; Panserat i col·l, 2000a). Caseras i col·l (2000) han demostrat la seva funcionalitat mitjançant experiments de transcripció/traducció *in vitro*. El cDNA que codifica per a la GCK en peixos dona lloc a la síntesi d'una proteïna d'uns 54 kDa que comparteix una homologia del 75-80% amb les isoformes descrites per mamífers (Caseras i col·l, 2000).

A més, l'expressió de la GCK hepàtica està modulada per l'estat nutricional en peixos (Caseras i col·l 2000, 2002; Panserat 2000c, 2001). Existeix una correlació positiva entre la quantitat de dieta aportada a *S. aurata*, el creixement i l'activitat d'enzims implicats en el metabolisme intermediari. L'alimentació amb baixa quantitat de dieta causa una disminució en l'activitat dels enzims implicats en la glicòlisi i en la via de pentoses fosfat, de manera similar com succeeix en orades de dejunades (Metón i col·l, 1999a, 1999b; Caseras i col·l, 2000). S'ha observat que dietes riques en carbohidrats promouen increments en l'expressió de GCK en fetge de peixos (Caseras i col·l 2000; Panserat i col·l, 2000c, 2001; Capilla i col·l, 2003; Kirchner i col·l, 2005).

Aquests fets suggereixen que els peixos disposen de la maquinària hepàtica adequada per metabolitzar i produir glucosa, i canvia la visió atribuïda al deficient metabolisme hepàtic de glucosa que relacionava la baixa habilitat dels peixos a utilitzar-la amb una absència o baixa regulació de la GCK.

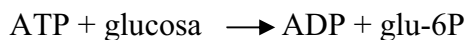
Una altra de les possibles causes de la baixa utilització dels carbohidrats en peixos havia estat atribuïda a una deficient secreció d'insulina en peixos (Palmer i col·l, 1972; Fuirichi i Yone, 1981). Malgrat això, diversos autors han observat que la concentració plasmàtica d'insulina en peixos és òptima i que, sota certes condicions, els nivells d'insulina incrementen després d'una càrrega intraperitoneal o intravenosa de glucosa (Mommensen i Plisetskaya, 1991; Carneiro i col·l, 1993; Blasco i col·l, 1996), així com, després de la ingesta de dietes riques en carbohidrats (Párrizas i col·l, 1994b).

Els salmònids, en comparació amb mamífers o altres espècies de peixos no carnívors, presenten un baix nombre de receptors d'insulina en múscul esquelètic (Párrizas i col·l, 1994a); malgrat això, s'ha observat que existeix inducció de l'expressió d'aquests receptors en el múscul blanc en alimentar els peixos amb dietes riques en carbohidrats (Párrizas i col·l, 1994a; Baños i col·l, 1998).

L'entrada o sortida de glucosa a través de la membrana plasmàtica cel·lular és un altre aspecte important en la regulació de la glucèmia (Burant i col·l, 1991; Thorens B., 1993). El transport facilitat de glucosa és dut a terme mitjançant unes proteïnes que pertanyen a la família dels GLUTs (GLUcose Transporters). L'absència de transportadors de glucosa en fetge de peixos fou també considerada una possible causa de la intolerància a glucosa (Cowey i Walton, 1989; Moon i col·l, 2001). En aquests organismes, han estat clonades diferents isoformes de transportadors de glucosa homòlogues a GLUTs de mamífers. Va ser identificat GLUT1 a *Oncorhynchus mykiss*, *Cyprinus carpio* i *Gadus morhua* (Teerijoki i col·l, 2000, 2001; Hall, R., 2004), GLUT2 a *Oncorhynchus mykiss* (Krasnov i col·l, 2001), GLUT 3 a *Ctenopharyngodon idellus* (Zhang i col·l, 2003) i *Gadus morhua* (Hall i col·l, 2005), i GLUT4 a *Salmo trutta* (Planas i col·l, 2000). La funcionalitat de GLUT2 va ser verificada en *Oncorhynchus mykiss* (Krasnov i col·l, 2001). Capilla i col·l (2004) demostren la presència de GLUT4 en teixits sensibles a insulina i la seva funcionalitat. Aquests autors assenyalen que el GLUT4 de truita és estructural i funcionalment homòleg al de mamífers però amb menys afinitat per la glucosa, el que podria contribuir, en part, a la baixa habilitat dels peixos per metabolitzar la glucosa (Capilla i col·l, 2004).

1.2. GLUCOQUINASA

La glucoquinasa o hexoquinasa IV, catalitza la primera reacció de la glucòlisi fosforilant la glucosa a glu-6P.



La GCK presenta característiques que permeten distingir-la de la resta d'hexoquinases (Printz i col·l, 1993; Iynedjian P.B., 1993):

- La primera característica diferencial és la baixa afinitat per la glucosa. La Km de la GCK hepàtica de mamífers en relació a aquest substrat és de l'ordre de 10 mM, mentre que les Km de les HK se situen a l'entorn de 100 µM. La GCK presenta també, una afinitat més baixa que les altres HK en relació a altres d'hexoses.

- Presenta un patró d'expressió restringit. La GCK s'expressa fonamentalment en fetge i en cèl·lules β-pancreàtiques, a diferència de la resta d'HK que tenen un ampli patró d'expressió. L'especificitat d'expressió tissular està correlacionada amb l'especialització funcional de la GCK.

- La GCK presenta escassa inhibició pel producte de la reacció que catalitza, glu-6P, a diferència de la resta d'HK, que són inhibides a concentracions fisiològiques d'aquest metabòlit.

- La GCK és modulada per una proteïna reguladora específica (GKRP), que reté la GCK en el nucli en presència de baixos nivells de glucosa i en presència de fru-6P (Van Schaftingen i col·l, 1989; Vandercarmmen i col·l, 1991). La proteïna reguladora du a terme funcions relacionades amb la localització cel·lular i l'estabilitat de la GCK.

- La GCK té un pes molecular de 52 kDa, que correspon a la meitat del pes molecular de la resta d'hexoquinases.

En mamífers, la GCK s'expressa principalment en fetge i en cèl·lules β -pancreàtiques, encara que també és present en cervell, intestí, ronyons, glàndules mamàries, i illots de Langerhans (Liang i col·l, 1991; Magnuson i col·l, 1992; Jetton i col·l, 1994; Postic i col·l, 2001; Schuit i col·l, 2001; Penicaud i col·l, 2002). L'enzim hepàtic controla els nivells de glucosa circulants a través de la seva metabolització en els hepatòcits i el seu emmagatzemament com a glicogen (Sharma i col·l, 1964; Sols i col·l, 1964). D'altra banda, la isoforma pancreàtica actua com a sensor de glucosa per a la secreció d'insulina per part de les cèl·lules β pancreàtiques (Matschinsky i col·l, 1968; Meglasson i Matschinsky, 1984; Sweet i Matschinsky, 1995; Matschinsky F.M., 1996; Wang i Iynedjian, 1997; Postic i col·l, 2001; Bell i col·l, 2002).

La GCK exerceix una funció essencial en l'homeòstasi de la glucosa (Meglasson i Matschinsky, 1984; Magnuson M.A., 1990; German M.S., 1993; Efrat i col·l, 1994 a,b; Postic i col·l, 2001; Matschinsky, 2002; Magnuson i Matschinsky, 2004; Matschinsky F.M., 2005). Les característiques termodinàmiques, cinètiques i moleculars de la GCK són idònies per al control d'aquesta funció. Petits canvis d'expressió de GCK donen lloc a un impacte en la glucèmia (Iynedjian P.B., 1993; Ferre i col·l, 1996; O'Doherty i col·l, 1996; Agius i col·l, 1996; Hariharan i col·l, 1997; Niswender i col·l, 1997b).

Una evidència de la importància que presenta la GCK en l'homeòstasi de la glucosa és el fet de què mutacions en la *GCK* causen desordres en la glucèmia en humans. Múltiples mutacions identificades en el gen de la *GCK* es relacionen amb la forma MODY 2 (*Maturity Onset Diabetes of the Young type 2*) de la diabetis tipus 2 en humans (descriu a l'apartat 1.2.3.C).

S'ha suggerit que la GCK, en cèl·lules β -pancreàtiques i en hepatòcits, pot funcionar com a missatger molecular directe ("GCK *switch*") independent del metabolisme, essent la unió del substrat o l'inhibidor al lloc actiu de la GCK més important per a la inducció d'aquesta, que no pas els intermediaris metabòlics o l'alliberament d'insulina (Zelent i col·l, 2006).

En vertebrats, s'han aïllat els cDNA que codifiquen per a la GCK hepàtica d'humà, rata, ratolí, i *Xenopus laevis*, així com per a la GCK pancreàtica de mamífers (Andreone i col·l, 1989; Magnuson i col·l, 1989a; Tanizawa i col·l, 1991; Koranyi i col·l, 1992; Postic i col·l, 1995). Recentment, s'ha clonat el cDNA que codifica per a la GCK hepàtica d'orada, carpa i truita (Caseras i col·l, 2000; Panserat i col·l, 2000a). Així mateix, s'ha clonat i caracteritzat la GCK hepàtica i pancreàtica de pollastre (Berradi i col·l, 2005).

1.2.1. CARACTERÍSTIQUES CINÈTIQUES

La GCK presenta cinètica sigmoïdal respecte a la glucosa. La GCK és un enzim monomèric amb un únic lloc d'unió a glucosa. Malgrat això, la GCK hepàtica de rata presenta cooperativitat positiva en relació a la glucosa. Aquest comportament cinètic es reflecteix en el coeficient de Hill, que és de l'ordre de 1,2-1,5. La GCK, en canvi, no mostra cooperativitat en relació a l'ATP (Storer i col·l, 1976). Per tal d'explicar aquest tipus de cooperativitat s'han proposat dos models. El model mnemònic, segons el qual la glucosa s'uniria amb diferent afinitat a dues conformacions diferents de la GCK, de manera que la unió d'una molècula de glucosa provocaria un canvi conformacional que afavoriria la fosforilació de noves molècules de glucosa (Ricard i col·l, 1977; Storer, i col·l, 1977). Segons el model de transició lenta (Neet K.E., 1980), existeixen dues conformacions que poden dur a terme un cicle catalític però amb diferent comportament per a la glucosa. La concentració de glucosa determinaria la distribució entre els dos estats. Moukil i col·l (2001) han proposat un model que combina característiques dels dos anteriors. Recentment, Heredia i col·l (2005) han suggerit que l'enzim pateix un canvi conformacional reversible en dues fases induït per la glucosa. Inicialment, la GCK s'uneix a la glucosa formant un intermediari de transició seguit d'un canvi conformacional que dona lloc a un complex catalíticament actiu. Aquesta transició lenta entre les dues conformacions enzimàtiques, modulada per la glucosa, podria ser la base cinètica de la regulació al·lostèrica de la GCK.

Estudis de l'estructura de GCK cristal·litzada han confirmat l'existència d'un sol lloc d'unió a glucosa (Grimsby i col·l, 2003; Brocchurst i col·l, 2004; Kamata i col·l, 2004), així com l'existència d'una forma oberta i d'una forma tancada de GCK (figura 2).

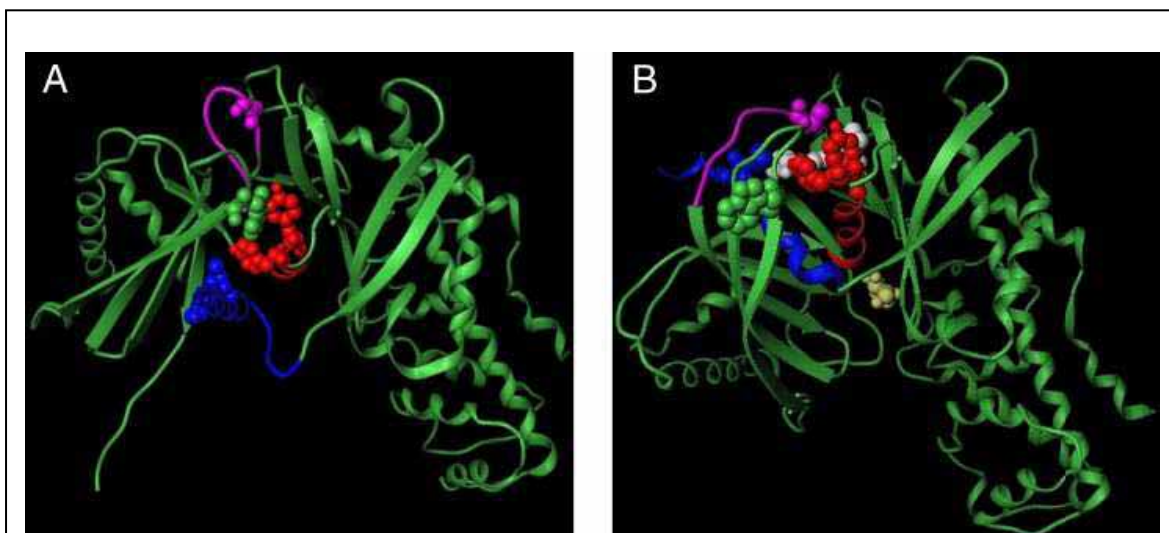


Figura 2: Estructura deduïda a partir de la cristal·lització de la GCK humana (Kamata i col·l, 2004; Heredia i col·l, 2006). La figura A il·lustra l'estructura tridimensional de la GCK, i la figura B mostra la forma co-cristal·litzada de la GCK amb l'activador de la GCK il·lustrat de color blanc, i la glucosa, que es mostra de color groc. Les regions descrites per Pedelini i col·l (2005) com a estructuralment importants per a la regulació al·lostèrica de la GCK es mostren en color vermell (hèlix 5 α), en blau (hèlix 13 α), i en lila (gir flexible).

Com en rata, tant la GCK d'*Sparus aurata*, com la de *Salmo salar*, presenten una corba sigmoïdal per a la glucosa (Tranulis i col·l, 1996; Caseras i col·l, 2000; Panserat i col·l, 2000c). La GCK hepàtica de rata és inhibida competitivament per l'anàleg de glucosa *N*-acetilglucosamina. Les activitats de GCK hepàtica d'*Sparus aurata*, *Salmo salar* i *Oncorhynchus mykiss* també són inhibides per *N*-acetilglucosamina, però en aquests casos l'efecte inhibitori és major que en rata (Tranulis i col·l, 1996; Caseras i col·l, 2000; Panserat i col·l, 2000c). Els nivells d'activitat GCK en fetge de *Salmo salar* i *Sparus aurata* són inferiors als observats normalment en rates alimentades, essent similars però, als descrits per a rates dejunades o diabètiques (Iynedjian i col·l, 1987, 1988, 1989; Magnuson i col·l, 1989a; Tranulis i col·l, 1996; Caseras i col·l, 2000).

1.2.2. ESTRUCTURA DEL GEN *GCK*

En mamífers, les isoformes hepàtica i pancreàtica de *GCK* estan codificades per un únic gen. Aquest gen està present en forma d'una sola còpia en el genoma humà (Tanizawa i col·l, 1991), de rata (Magnuson i col·l, 1989a; 1990) i de ratolí (Postic i col·l, 1995). L'estructura del gen *GCK* està conservada en aquestes tres espècies.

El gen de rata està format per dotze exons que ocupen més de 35 Kb de DNA. Els dos primers exons del gen, 1 β i 1F, estan separats per més de 20 Kb i corresponen als primers exons de les formes pancreàtica i hepàtica, respectivament. L'exó 2A, situat entre els exons 1F i 2, va ser descobert posteriorment a la resta d'exons del gen i apareix com a un exó opcional en alguns missatgers aïllats en fetge de mamífers (Hayzer i Iynedjian, 1990; Tanizawa i col·l, 1991). Els nou exons següents, numerats del 2 al 10, són comuns a les formes hepàtica i pancreàtica de l'enzim.

L'expressió de la *GCK* és específica de teixit i implica dos promotors alternatius (figura 3) que es regulen de forma diferent (Iynedjian i col·l, 1989; Magnuson i col·l, 1989a,b, 1990). L'expressió de la forma pancreàtica, determinada pel promotor situat a l'extrem 5', és un determinant clau en la secreció d'insulina en resposta a glucosa. La forma pancreàtica s'expressa també en cèl·lules neuroendocrines de cervell, intestí, tiroides i sistema nerviós central (Jetton i col·l, 1994). El promotor situat entre els exons 1 β i 1F dirigeix l'expressió de la forma hepàtica de l'enzim (Magnuson i col·l, 1989b; Granner i Pilkis, 1990; Matschinsky F.M., 1990; Pilkis i col·l, 1992).

Els dos promotors esmentats determinen la utilització d'exons 1 diferents (β o F), de forma que els missatgers de les formes hepàtica i pancreàtica de la *GCK* es distingeixen pels seus extrems 5'. L'mRNA de pàncrees és lleugerament més llarg que el de fetge (2,6 kb i 2,4 kb en rata, respectivament; 2,9 kb i 2,8 kb en humans, respectivament). El codó d'inici de traducció forma part de l'exó 1, fet que provoca que la divergència entre les isoformes pancreàtica i hepàtica no només afecti a la regió 5' no traduïda dels missatgers, sinó que també repercuteixi en els primers aminoàcids de les proteïnes per a les que codifiquen. L'extrem N-terminal d'ambdues proteïnes difereix en 13-15 residus, mentre que la resta de la seqüència és idèntica.

La *GCK* també experimenta altres formes de processament alternatiu. El gen de rata presenta un acceptor alternatiu de processament en l'exó 4; es generen formes minoritàries de missatger en les que s'han deletat 51 nucleòtids a fetge i pàncrees. Els mRNA formats donen lloc a proteïnes 17 aminoàcids més curtes, les quals no presenten activitat enzimàtica (Magnuson i col·l, 1989b; Liang i col·l, 1991).

A fetge de rata s'ha descrit la presència d'un missatger, identificat de forma molt minoritària (5%), que conté l'exó opcional 2A, de 151 parells de bases. A més, aquest mRNA presenta 52 nucleòtids menys en l'extrem 3' de l'exó 2 com a resultat d'un processament alternatiu. El resultat d'aquest procés és l'aparició d'un mRNA que conté un marc obert de lectura per a una proteïna de 498 aminoàcids (Hayzer i col·l, 1990) sense activitat enzimàtica (Quaade i col·l, 1991).

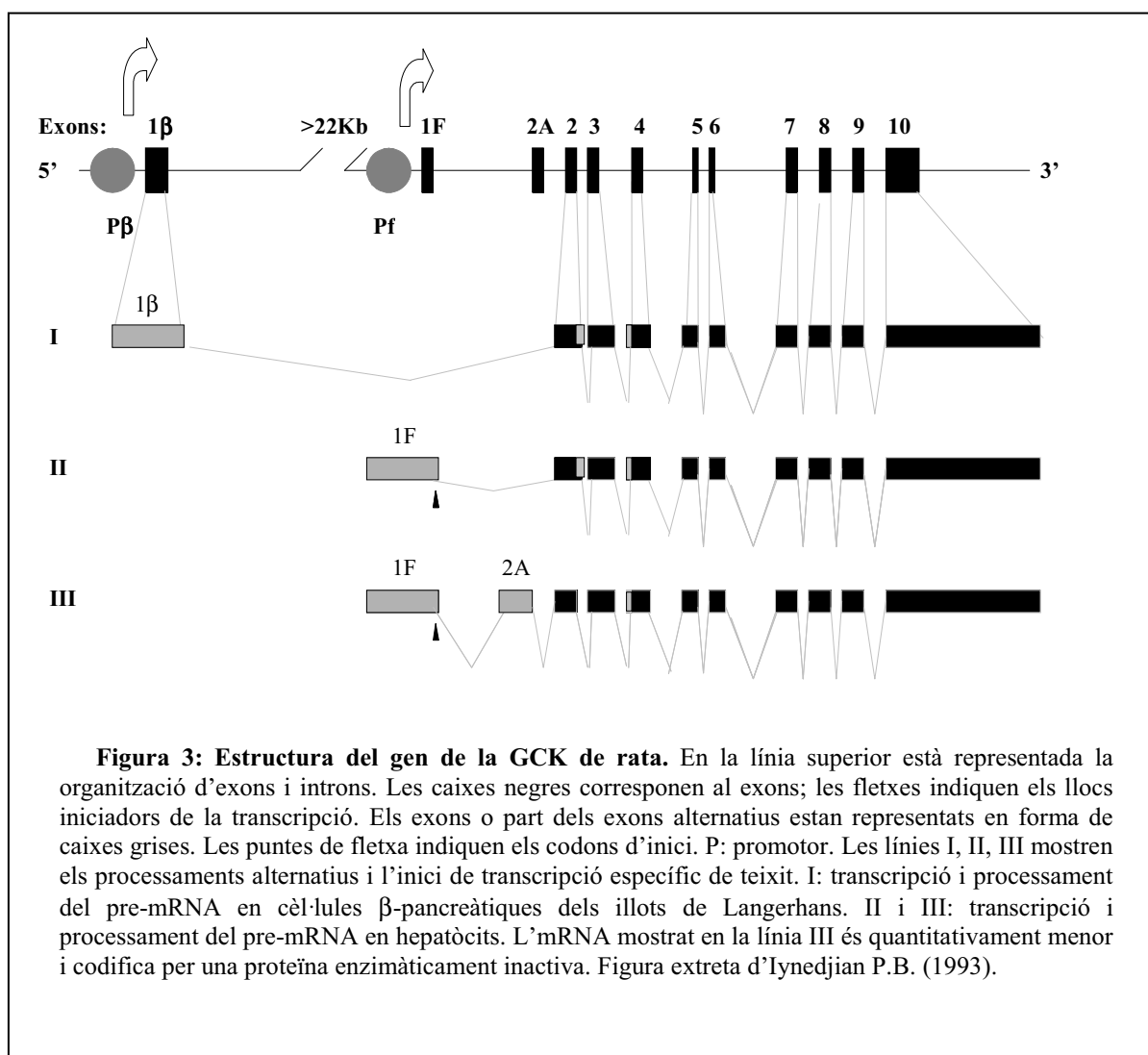


Figura 3: Estructura del gen de la GCK de rata. En la línia superior està representada la organització d'exons i introns. Les caixes negres corresponen al exons; les fletxes indiquen els llocs iniciadors de la transcripció. Els exons o part dels exons alternatius estan representats en forma de caixes grises. Les puntes de fletxa indiquen els codons d'inici. P: promotor. Les línies I, II, III mostren els processaments alternatius i l'inici de transcripció específic de teixit. I: transcripció i processament del pre-mRNA en cèl·lules β-pancreàtiques dels illots de Langerhans. II i III: transcripció i processament del pre-mRNA en hepatòcits. L'mRNA mostrat en la línia III és quantitativament menor i codifica per una proteïna enzimàticament inactiva. Figura extreta d'Iynedjian P.B. (1993).

Es generen formes inactives truncades de la proteïna de fetge de rata quan s'utilitzen conjuntament el lloc de processament alternatiu present en l'exó 2 i el lloc de processament de l'exó 4, així com quan s'utilitza el lloc de processament present en l'exó 2 sense que es produeixi la inserció de l'exó 2A (Tanizawa i col·l, 1991).

La identificació de missatgers que donen lloc a proteïnes truncades o privades d'activitat enzimàtica suggereix que el mecanisme de processament alternatiu ofereix una via addicional de control en l'expressió del gen *GCK*.

Les formes hepàtica i pancreàtica de la GCK de rata presenten 465 aminoàcids i tenen un pes molecular de 52 kD. La forma pancreàtica humana es correspon a una proteïna de 465 aminoàcids, mentre que la GCK hepàtica humana en presenta 466. La isoforma deduïda de la seqüència nucleotídica de la GCK hepàtica de granota conté 458 aminoàcids. Els cDNA descrits per a la GCK hepàtica d'orada, carpa i truita codifiquen proteïnes de 478, 471 i 476 aminoàcids, respectivament.

1.2.3. AMINOÀCIDS CLAU PER A L'ACTIVITAT GCK

1.2.3.A. Aminoàcids implicats en la unió a substrats: glucosa i ATP

En relació a la homologia que presenten les seqüències que codifiquen per a les diferents HK, s'ha descrit que els aminoàcids situats entre les posicions K¹⁴⁴ a F¹⁷¹ de la GCK hepàtica de rata estan relacionats amb la unió de l'enzim a glucosa (Andreone i col·l, 1989). Cal destacar també el paper dels residus D²⁰⁵, E²⁵⁶, E²⁹⁰, D⁴⁰⁹ i Y⁴¹³ de la GCK hepàtica de rata en la unió a glucosa (Andreone i col·l, 1989). Estudis posteriors han corroborat el paper d'E²⁵⁶ (Gidh-Jain i col·l, 1993) i han evidenciat la intervenció de G²⁶¹ (Stoffel i col·l, 1992) i d'E⁷⁰ (Burke i col·l, 1999) en la unió de la GCK pancreàtica humana a la glucosa.

Les mutacions dels aminoàcids G⁸⁰ i T¹⁶⁸ promouen disminucions importants de l'activitat enzimàtica de la GCK *in vitro*, així com una pèrdua en la cooperativitat de l'enzim en relació a la glucosa i un increment de les K_m per glucosa i ATP (Miller i col·l, 1999). La substitució de la T²⁰⁶ per una M produeix la inactivació de l'enzim. S'ha suggerit que aquest fet està provocat per una disminució de l'afinitat de l'enzim per la glucosa (Galan i col·l, 2006). La substitució de la L¹⁶⁵ per una F produeix una disminució de l'afinitat de l'enzim per glucosa i ATP, aquesta mutació causa una disminució de l'estabilitat de la proteïna *in vitro* (Galan i col·l, 2006).

Els aminoàcids situats entre les posicions 78 a 102 de la GCK de fetge de rata presenten un grau d'homologia elevat amb les seqüències descrites per a diverses HK i podrien estar implicats en la unió de la GCK a l'ATP (Andreone i col·l, 1989). Tant T²²⁸ (Stoffel i col·l, 1992) com G²⁶¹ i K⁴¹⁴ són també aminoàcids importants per a la unió de la GCK a l'ATP (Liang i col·l, 1995).

La seqüència aminoacídica deduïda per a la GCK hepàtica de peixos conserva molts dels residus de la isoforma de rata que estan implicats en la unió a glucosa i ATP. La GCK descrita en peixos conserva els aminoàcids D²⁰⁵, E²⁵⁶, G²⁶¹, E²⁹⁰, i la regió compresa entre

K¹⁴⁴ i F¹⁷¹, què estan implicats en la unió a glucosa en la isoforma de rata (Andreone i col·l, 1989; Stoffel i col·l, 1992; Gidh-Jain i col·l, 1993; Burke i col·l, 1999). Els residus T²²⁸, G²⁶¹, K⁴¹⁴ proposats com a responsables de la unió a ATP en la GCK de rata, estan conservats en la GCK de peixos (Stoffel i col·l, 1992; Liang i col·l, 1995).

1.2.3.B. Aminoàcids implicats en la unió a la GGRP

S'ha descrit que els aminoàcids V²⁰³ i N²⁰⁴, i l'agrupació formada per E⁵² i H¹⁴¹, K¹⁴², K¹⁴³, i L¹⁴⁴ intervenen en la unió de la GCK a GGRP (Veiga da Cunha i col·l, 1996a,b; Moukil, i col·l, 2000). Aquestes dades corresponen a un model en el que un petit domini i una regió bisagra estarien implicats en la unió. Altres estudis indiquen que la zona d'interacció entre les proteïnes és més àmplia (Shiota i col·l, 1999). Estudis recents revelen la presència d'una regió d'unió formada per motius leucina-asparagina, present en diferents àrees de la GCK, què resultaria imprescindible per a la interacció de GCK amb GGRP (Baltrusch i col·l, 2005).

Tot i que no s'ha demostrat l'existència d'aquesta proteïna en peixos, molts dels aminoàcids corresponents a la unió amb GGRP estan conservats en l'enzim de diferents espècies de peix com *Sparus aurata*, *Oncorhynchus mykiss*, i *Cyprinus carpio*.

1.2.3.C. Mutacions de GCK relacionades amb desordres en la glucèmia

La relació entre la hiperglicèmia i mutacions en la *GCK* es va descriure per primera vegada a l'any 1992 (Froguel i col·l, 1992). Des de llavors, s'han descrit més de 200 mutants d'aquest gen capaços de causar hiperglicèmia o hipoglucèmia, depenent del tipus de mutació (Gloyn i col·l, 2003). En termes generals, les mutacions en el gen *GCK* que donen lloc a un increment en l'activitat produeixen hipoglicèmia (Glaser i col·l, 1998; Christesen i col·l, 2002; Gloyn i col·l, 2003). Pel contrari, les mutacions que generen una disminució en l'activitat enzimàtica de *GCK* causen hipoinsulinèmia i hiperglicèmia. Les mutacions produïdes en els dos al·lèls produeixen la diabetis mellitus permanent neonatal (Njolstad i col·l, 2001), i en un al·lel, condueixen a la forma MODY de la diabetis tipus 2 (Vionnet i col·l, 1992). La diabetis tipus 2 es caracteritza per l'existència de defectes en la secreció d'insulina en resposta a glucosa, així com per una resistència perifèrica a l'acció d'aquesta hormona (Petersen i Shulman, 2006). Les mutacions en el gen *GCK* constitueixen una causa important en l'establiment de la diabetis tipus 2 en humans (Froguel i col·l, 1992; Vionnet i col·l, 1992; Liang i col·l, 1995; Kesavan i col·l, 1997; Velho i col·l, 1997; Burke i col·l, 1999; Davis i col·l, 1999; Fajans i col·l, 2001; Gloyn i col·l, 2005; Matchinsky i col·l, 2005; Galan i col·l, 2006; García-Herrero i col·l, 2007).

1.2.4. PROMOTOR DE LA GCK

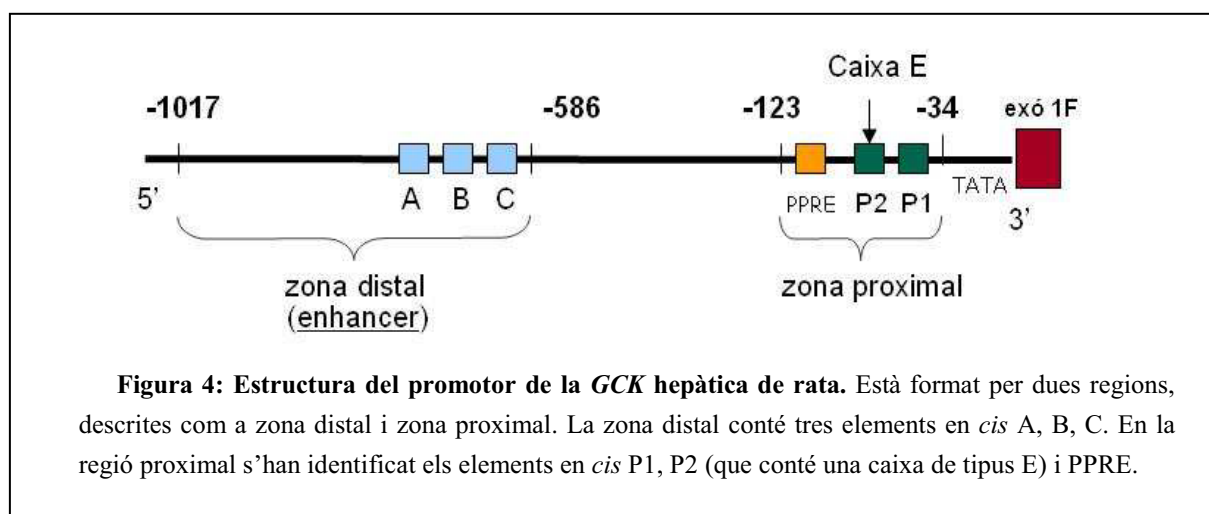
El promotor hepàtic de la *GCK* mostra una elevada especificitat de teixit; el promotor pancreàtic dóna lloc, en canvi, a totes les formes de *GCK* identificades en teixits extrahepàtics (Iynedjian P.B., 1998).

Pel que fa al promotor de la *GCK* hepàtica de rata s'ha clonat una regió de 3,4 kb de DNA, situada en posició 5' respecte de l'exó 1F del gen, i se n'ha determinat l'activitat transcripcional. En la seqüència promotora existeixen dues regions, anomenades distal i proximal. El fragment corresponent a la zona distal, que conté els pb -1017 a -586 en relació a l'inici de transcripció, presenta característiques d'un *enhancer*. Aquest fragment només es mostra actiu en hepatòcits primaris, sense generar activitat transcripcional en cèl·lules FTO-2B ni en cèl·lules d'insulinoma; actua, per tant, limitant l'expressió de la *GCK* a hepatòcits primaris (Iynedjian i col·l, 1996).

En el fragment distal s'ha descrit la presència de tres elements *cis* (anomenats A, B i C). Els elements A i C estimulen la transcripció del gen, mentre que B actua com a repressor. Aquests elements *cis* identificats en rata estan conservats en el gen de la *GCK* humana; addicionalment, l'*enhancer* humà es mostra transcripcionalment actiu en hepatòcits de rata (Iynedjian i col·l, 1996), (figura 4).

La zona proximal del promotor de la *GCK* hepàtica de rata, situada entre les posicions -123 a -34 respecte de l'inici de transcripció, és transcripcionalment activa en hepatòcits primaris, però és inactiva en cèl·lules d'insulinoma. Aquests resultats suggereixen que la zona proximal del promotor de *GCK* confereix especificitat de teixit (Iynedjian i col·l, 1996).

S'han identificat dos llocs d'unió a proteïna en la zona proximal del promotor de la *GCK* hepàtica de rata (Iynedjian P.B., 1998). El primer element *cis* (P1) se situa entre les posicions -54 i -35 del promotor, mentre que el segon element (P2) engloba els parells de bases -89 a -81. P2, responsable del 50% de l'activitat transcripcional, conté la seqüència 5'-CCCACGTGG-3' que constitueix una caixa de tipus E.



El promotor de la *GCK* pancreàtica de rata ha estat delimitat en una regió de 280 pb, en posició 5' respecte de l'inici de transcripció situat en l'exó 1β del gen. L'anàlisi de la regió

del promotor revela l'existència de dos tipus d'elements necessaris per a la transcripció (Shelton i col·l, 1992). S'ha descrit la presència d'elements UPE (*upstream promoter element*), i seqüències palindròmiques (Pals). S'han identificat en rata tres seqüències UPE, de les quals només UPE-3 està conservada en el gen de ratolí i humans. Als elements UPE, també anomenats caixes CT, s'uneix una proteïna de 50 kDa que s'expressa en cèl·lules β de pàncrees. Pel que fa a les seqüències Pal-1 i Pal-2 estan perfectament conservades en mamífers (Iynedjian P.B., 2004).

1.2.5. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

La GCK presenta un paper determinant a nivell de metabolisme dels carbohidrats; i, a diferència de les altres HK, la seva expressió gènica es regula en funció de les condicions nutricionals i hormonals.

La presència de promotors alternatius per a les isoformes de fetge i de pàncrees possibilita que diferents mecanismes intervinguin en la regulació de l'expressió gènica de la GCK en aquests dos teixits.

1.2.5.A. Regulació per factors de transcripció

S'han identificat dos elements de resposta a esterols, SREa i SREb, en el promotor de la *GCK* de fetge de rata i s'ha observat que SREBP-1c interacciona amb aquestes regions activant el promotor. Una dieta rica en carbohidrats incrementa la unió d'SREBP-1c a la zona -221/-169 pb del promotor de la *GCK* de fetge de rata que conté els elements SREa i SREb (Kim, i col·l, 2004a). Estudis posteriors han revelat que la unió d'SREBP-1c a la zona -221/-169 del promotor de la *GCK* hepàtica de rata s'incrementa també per acció d'insulina, suggerint que la unió d'SREBP-1c als elements de resposta SREa i SREb és la responsable de l'expressió de *GCK* hepàtica de rata en resposta a d'insulina (Foretz i col·l, 1999a; Kim i col·l, 2004a). Pel contrari, recentment s'ha descrit que SREBP-1 no actua com a mediador de l'acció de la insulina en l'expressió de *GCK* (Hansmannel i col·l, 2006; Gregori i col·l, 2006).

La caixa de tipus E localitzada entre els pb -89 a -81 és reconeguda per factors de transcripció de la família *basic helix-loop-helix zip*, com c-myc i els *upstream stimulatory factors* USF1 i USF2 (Bendall i col·l, 1994). Si bé c-myc no sembla dur a terme una funció activadora, USF1 sí que és capaç d'unir-se a P2 i d'incrementar *in vitro* l'activitat promotora de *GCK* hepàtica de rata (Iynedjian P.B., 1998). La unió dels factors USF al promotor de *GCK* no varia en presència d'insulina o glucagó i, per tant, aquests factors de transcripció no semblen implicats en l'activació de la transcripció de *GCK* hepàtica de rata en resposta a insulina (Iynedjian i col·l, 2004). S'ha observat que ratolins transgènics que sobreexpressen c-myc presenten nivells incrementats de missatger i d'activitat GCK a fetge (Valera i col·l, 1995; Riu i col·l, 1996). Aquests resultats podrien explicar-se considerant que concentracions elevades de c-myc podrien activar la transcripció de la *GCK* per unió a la caixa E de l'element P2 present en la regió proximal del promotor hepàtic de la *GCK* (Iynedjian, P.B. 1998, 2004).

Existeix una seqüència TATTT, localitzada entre les posicions -29 a -25 del promotor de *GCK* de rata, que podria considerar-se una caixa TATA (Magnuson i col·l, 1989). Estudis d'alineament de seqüències mostren que aquesta caixa està conservada en ratolí, rata i humans (Postic, i col·l, 1995).

Magnuson i col·l (1989a) han descrit la presència d'una seqüència rica en C i G (CCCCGCCCC) en el promotor de la *GCK* de rata, situada entre les posicions -442 i -443, com a possible lloc d'unió del factor de transcripció Sp1, tot i que no ha s'ha estudiat la seva implicació en la regulació de l'expressió de *GCK*.

S'ha suggerit que el factor de transcripció Stat5B podria mediar l'activació transcripcional del promotor de la *GCK* hepàtica humana i de rata en presència d'insulina (Sawka-Verhelle i col·l, 2000). Recentment, Ribaux i col·l (2003) han descartat la implicació d'Stat5B en la inducció de la *GCK* per insulina.

En hepatòcits primaris de rata, s'ha observat que l'expressió del gen que codifica per a la *GCK* és activat per HNF-4 α , factor que s'uneix a la regió situada a -59/-39 pb respecte l'inici de la transcripció. S'ha suggerit que HNF-4 α podria regular l'expressió zonal de la *GCK* (Roth i col·l, 2002).

HNF-1 s'uneix a la seqüència ATTAAC localitzada entre els pb -171 a -166. S'ha demostrat que aquesta unió és indispensable per a l'expressió tissular específica de *GCK* (Iynedjian i col·l, 1988). Una altra proteïna que controla de manera específica l'expressió hepàtica és l'anomenada *liver factor A1* que s'uneix a la seqüència de DNA TG(G/A)(A/C)CC. S'han detectat diverses còpies d'aquesta seqüència en la regió promotora de *GCK* (Hardon i col·l, 1988).

Estudis de Lannoy i col·l (2002) demostren que HNF-6 s'uneix al promotor de *GCK* de ratolí activant-ne la transcripció; les seqüències d'unió estan conservades en el promotor de *GCK* de rata.

En ratolins transgènics que sobreexpressen HNF-3 β s'ha pogut detectar un increment significatiu en l'expressió postnatal de *GCK*, suggerint que la transcripció de la *GCK* pot estar regulada per HNF-3 β . El promotor hepàtic de la *GCK* conté un lloc d'unió a HNF-3 β localitzat entre les posicions -797 i -784 en relació a l'inici de transcripció (Rausa i col·l, 2000).

El factor HIF-1 estimula l'expressió de *GCK* en hepatòcits a través de la unió a una caixa de tipus E situada en posició -87 respecte l'inici de transcripció. L'activació a través de HIF-1 és estimulada per co-expressió amb HNF4 i el cofactor p300. S'ha suggerit que la sinèrgia entre HIF-1, HNF4 i p300 pot jugar un paper important en l'estimulació del promotor de *GCK* per insulina (Roth i col·l, 2004). Aquests autors també demostren la participació diferencial d'HIF-1 i USF en la modulació de l'expressió de *GCK* en resposta a diferents nivells d'oxigen (Roth i col·l, 2004).

Estudis en hepatòcits de rata amb vectors adenovirals, confirmen que Foxo1 estimula l'expressió de gens gluconeogènics i suprimeix l'expressió dels gens implicats en glicòlisi, en la via de pentoses fosfat i en la lipogènesi, incloent *GCK* i *SREBP-1c*. Foxo1 podria tenir un paper important en la regulació de vies hepàtiques en resposta al dejú i realimentació. En animals alimentats, quan els nivells d'insulina estan elevats, Foxo1 suprimeix l'expressió de gens implicats en la glicòlisi, com la *GCK* (Zhang i col·l, 2006). Iynedjian P.B. (2004)

suggereix que Foxo1 podria actuar com a mediador de la regulació de la transcripció de la *GCK* hepàtica per insulina.

Ha estat descrit que PPAR- γ podria actuar regulant la transcripció de *GCK* hepàtica unint-se entre els pb -116 i -104 (Kim i col·l, 2004b).

D'altra banda, en relació al promotor pancreàtic, s'ha demostrat que el fragment que comprèn els -278 pb corrent amunt respecte l'inici de transcripció conté tots els elements necessaris per al control de la transcripció del promotor de la *GCK* (Shelton i col·l, 1992; Jetton i col·l, 1994, 1998; Moates i col·l, 1996; Iynedjian P.B., 2004). S'ha descrit que el factor de transcripció Pdx-1 s'uneix a l'element UPE3. Aquest factor està implicat en la diferenciació pancreàtica (Watada i col·l, 1996; Chakrabarti i col·l, 2002; Cissell i col·l, 2003). S'ha demostrat la unió d'altres factors de transcripció com són beta-2, Pax 6 i Nkx2.2 al promotor de la *GCK* pancreàtica de rata (Moates i col·l, 2003, 2004). En estudis recents, s'indica que IGF-1 estimula l'expressió de *GCK* pancreàtica a través de la unió de Foxo1 al promotor de rata (Yoshida i col·l, 2007).

1.2.5.B. Regulació nutricional i hormonal de la *GCK*

L'expressió del gen que codifica per a la *GCK* varia en funció de la dieta i en resposta a hormones (Sharma, i col·l, 1964; Niemeier i col·l, 1975; Weinhouse S., 1976; Bedoya i col·l, 1984, 1986; Barzilai i Rossetti, 1993; Iynedjian P.B., 1993; Caseras i col·l, 2000; Panserat i col·l 2000c; Soengas i col·l, 2006). La seva expressió disminueix en animals diabètics, sotmesos a dejú o alimentats amb dietes pobres en carbohidrats i és restaurada per realimentació o tractament amb insulina (Iynedjian i col·l 1988,1989; Magnuson i col·l, 1989a; Caseras i col·l, 2000).

Durant el desenvolupament, la *GCK* de rata està present en illots fetals de Langerhans al final de la gestació, mentre que no apareix en fetge fins al final de la lactància, en concordança amb el canvi d'alimentació: de dieta rica en greixos i baixa en carbohidrats (llet materna) a dieta adulta rica en carbohidrats. El canvi en el tipus de dieta va associat a un increment en la relació molar insulina/glucagó, la qual cosa sembla ser l'estímul inductor de la *GCK* (Iynedjian i col·l, 1987). En la vida adulta, els nivells de missatger hepàtic de *GCK* són pràcticament indetectables en rates mantingudes en dejuni i s'incrementen després de la ingesta de carbohidrats (Sibrowski i col·l, 1984; Iynedjian i col·l, 1987). L'activitat *GCK* a fetge de rates dejunades disminueix fins valors que es corresponen a un 50-70% en relació als observats en rates alimentades (DiPietro i col·l, 1960).

En peixos, s'ha observat que la *GCK* hepàtica incrementa tant a nivell d'activitat com d'mRNA, en incrementar el contingut de carbohidrats en la dieta (Tranulis i col·l, 1996; Caseras i col·l, 2000; Panserat i col·l, 2000a, 2000b, 2001; Capilla i col·l, 2003; Metón i col·l, 2003; Kirchner i col·l, 2005) i en peixos realimentats en relació a peixos dejunats (Caseras i col·l, 2000; Kirchner i col·l, 2005; Soengas i col·l, 2006). Condicions de dejú i restricció energètica condueixen a una disminució de l'expressió de *GCK* hepàtica, tant a nivell

d'mRNA com a nivell d'activitat en orades (Caseras i col·l, 2000). Així mateix, també s'han observat variacions en relació amb el ritme diari d'alimentació (Polakof i col·l, 2007).

S'han detectat diferències en els nivells d'mRNA i d'activitat de la GCK en pollastres alimentats front a dejunats durant 24 hores (Berradi i col·l, 2005).

En realimentar rates sotmeses a dejuni, l'activitat enzimàtica de GCK hepàtica augmenta però en un nivell més modest en relació a l'increment observat a nivell de missatger (Spence, 1983; Vaulont i col·l, 1986). S'ha descrit que la resposta de la GCK hepàtica a la realimentació, després d'un període de dejú, queda anul·lada quan les rates són tractades amb anticossos creats contra la insulina, fet que suggereix que l'estimulació promoguda per l'administració de glucosa estaria mitjançada per acció de la insulina (Niemeyer i col·l, 1967). El paper de la insulina com a efector positiu en l'expressió de la GCK hepàtica de rata s'evidencia per la dràstica reducció en l'expressió d'aquest enzim observada en cas de diabetis, situació en la que la immunodetecció de GCK hepàtica es veu reduïda en més d'un 90% en relació amb els valors control, a la vegada que el missatger de l'enzim és gairebé indetectable (Iynedjian i col·l, 1988). L'mRNA està absent en fetge de rates amb diabetis mellitus induïda per estreptozotocina, i incrementa ràpidament després del tractament amb insulina (Sibrowski i col·l, 1984; Iynedjian i col·l, 1988). Així mateix també s'ha observat la inducció d'mRNA de *GCK* per insulina en en cultiu d'hepatòcits humans (Iynedjian i col·l, 1995).

Els nivells de proteïna i d'activitat GCK també s'incrementen en fetge de rates per acció de la insulina; aquests augments s'observen més tard que en el cas del missatger, però es mantenen durant més temps (Iynedjian i col·l, 1988).

S'ha demostrat que l'efecte estimulador de la insulina té lloc a nivell transcripcional i de manera independent de la presència de glucosa (Iynedjian i col·l, 1989). En aquest sentit, el gen *GCK* es distingeix d'altres gens, en els quals l'efecte de la insulina només té lloc en presència de glucosa (Decaux i col·l, 1989).

La inducció de l'expressió de *GCK* per insulina requereix la senyalització a través de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K), ja que inhibidors de la PI3-K, com la wortmannina i LY294002, impedeixen la inducció de *GCK* a través d'insulina. La inducció també implica la participació de la cascada ERK1/2 (Iynedjian i col·l, 2000).

Tot i que s'han identificat elements de resposta a insulina en alguns gens hepàtics, no ha estat descrita cap IRE en el promotor hepàtic de la *GCK*.

D'altra banda, a diferència de la isoforma hepàtica, l'expressió de la *GCK* pancreàtica no depèn d'insulina (Magnuson i col·l, 1989b, 1990; Iynedjian P.B., 1993), està regulada fonamentalment per la presència de glucosa. Pel contrari, Iynedjian i col·l (1988, 1989) descriuen que l'mRNA de *GCK* pancreàtica no varia en situacions de dejuni i posterior realimentació, ni tampoc per administració oral de glucosa. Altres estudis, qüestionen l'absència de regulació nutricional de l'expressió de la *GCK* pancreàtica en rates (Tiedge i col·l 1999), i suggereixen novament que el metabolisme de la glucosa estimula l'expressió de la *GCK* pancreàtica.

1.2.5.C. Influència del glucagó i dels derivats de l'AMPc

El glucagó, i l'AMPc exerceixen un paper repressor, dominant i depenent de la dosi en la regulació de l'expressió de *GCK* hepàtica de mamífers (Sibrowski i col·l, 1982; Iynedjian i col·l, 1989). El glucagó s'uneix a un receptor lligat a proteïna G i condueix a un increment en els nivells intracel·lulars d'AMPc. En tractar hepatòcits de mamífers amb glucagó, la inducció de l'mRNA de *GCK* per insulina és inhibida (Iynedjian i col·l, 1989). Aquest efecte està en concordança amb el paper que presenta el glucagó en l'estimulació de la gluconeogènesi i glucogenolisi, mentre que suprimeix la glicòlisi i la síntesi de glicogen, vies en les que participa la *GCK*. En hepatòcits, què transcriuen activament el gen *GCK* durant el tractament amb insulina, l'addició d'AMPc reprimeix la transcripció gènica de *GCK* en uns 15 minuts, tot i que la insulina continuï present (Iynedjian i col·l, 1989). D'altra banda, els nivells d'mRNA i l'activitat de *GCK* pancreàtica estan incrementats en resposta a AMPc (Fernandez-Mejía i col·l, 2001).

1.2.5.D. Influència d'altres factors

La fru-2,6P₂ fou identificada com a activador al·lostèric de l'enzim glicolític PFK i inhibidor de l'enzim gluconeogènic FBP1 (Pilkis i col·l, 1981a,b,c; Van Schaftingen i Hers, 1981; Okar i col·l, 2001, 2004). Un elevat contingut en fru-2,6P₂ causa un increment en l'expressió gènica de *GCK*, i una disminució en l'expressió de *G6PC* en fetge de ratolins tractats amb estreptozotocina (model de ratolins diabètics que no expressen insulina), produïnt una supressió de la producció hepàtica de glucosa i una disminució de la glucèmia en aquests animals. Així, nivells elevats de fru-2,6P₂ poden restaurar els nivells d'expressió gènica de *GCK* en absència d'insulina (Wu i col·l, 2001, 2002, 2004). Fins al moment, l'expressió del gen hepàtic s'havia descrit com a insulino-depenent (Iynedjian, 1988, 1989a, 2000; Foretz i col·l, 1999a).

La triiodotironina (T3) condueix a un increment de la transcripció del gen hepàtic *GCK* de manera depenent de la dosi. Activa la transcripció del gen en hepatòcits de rates lactants exercint un efecte additiu amb el de la insulina, què és contrarestat, en part, per la presència de dexametasona (Narkewicz i col·l, 1990). La inducció del gen hepàtic *GCK*, durant la transició entre dejú-realimentació, disminueix en rates hipotiroídiques i és restaurada als seus nivells normals després de tractament amb T3 (Hoppner i col·l, 1989). S'ha descrit que l'hormona tiroidea T3 exerceix un efecte negatiu sobre els nivells d'mRNA pancreàtics (Fernandez-Mejía i col·l, 1992; García-Flores i col·l, 2001).

Alguns autors assenyalen que el glucocorticoide dexametasona no presenta un efecte estimulador per si mateix, malgrat que l'expressió de *GCK* es redueix al fetge de rates sotmeses a adrenalectomia (Sibrowski i col·l, 1984). Un requisit per a la inducció d'mRNA de *GCK* hepàtica per insulina en hepatòcits primaris és la presència de dexametasona (Iynedjian i col·l, 1989). L'efecte del glucocorticoide és permissiu (Narkewicz i col·l, 1990), és a dir, per

si mateix no indueix l'expressió de l'mRNA, però potencia l'estimulació per insulina i contraresta la resposta a T3 del gen *GCK* en hepatòcits de rates lactants (Narkewicz i col·l, 1990). D'altra banda, la dexametasona produeix una inducció dels nivells d'mRNA i d'activitat de la *GCK* pancreàtica (Fernandez-Mejía i col·l, 1992).

La biotina, vitamina hidrosoluble que participa com a cofactor en processos gluconeogènics i en la síntesi d'àcids grassos, estimula la transcripció del gen *GCK* a fetge de rata (Chauan i col·l, 1991). En rates deficientes en biotina, els nivells hepàtics de *GCK* estan disminuïts (Dakshinamurti i col·l, 1968a,b). En hepatòcits de rata, s'ha observat que la biotina exerceix un efecte estimulador sobre la *GCK*, tant a nivell d'mRNA com d'activitat (Spence i col·l, 1984; Rodriguez-Melendez i Zempleni, 2003; Dakshinamurti K., 2005). La biotina també estimula l'expressió de *GCK* pancreàtica, tant a nivell d'mRNA com a nivell d'activitat; així mateix afavoreix la secreció d'insulina (Romero-Navarro i col·l, 1999). En rates deficientes en biotina, l'activitat i els nivells d'mRNA de *GCK* pancreàtica són el 50 % dels nivells detectats en rates normals (Romero-Navarro i col·l, 1999).

S'ha descrit que l'àcid retinòic pot conduir a un increment en els nivells d'mRNA de la *GCK* hepàtica i pancreàtica (Decaux i col·l, 1997; Cabreva-Valldares i col·l, 1999, 2001).

D'altra banda, Kietzmann i col·l (1997) han demostrat que la pressió parcial d'oxigen (pO_2) influeix en l'expressió de *GCK* hepàtica. La inducció de l'expressió del gen *GCK* per insulina és més accentuada quan la pO_2 és baixa, és a dir en condicions perivenoses.

1.2.6. REGULACIÓ POST-TRADUCCIONAL I DE L'ACTIVITAT DE LA GCK

1.2.6.A. Proteïna reguladora de la GCK (GKRP)

La GKRP és una proteïna de 68 kDa que modula l'activitat de la *GCK* hepàtica de rata (Van Schaftingen i col·l, 1989a). Actua com a inhibidor fisiològic de l'activitat enzimàtica de *GCK* en absència de fru-1P. La inhibició exercida és reforçada per fru-6P, que actua competitivament amb la fru-1P. La presència de fru-1P promou el desplaçament de la fru-6P unida a la GKRP, i reverteix la inhibició exercida per GKRP sobre la *GCK*, què queda lliure. L'afinitat de la GKRP per la *GCK* disminueix en presència de fru-1P (Van Schaftingen i col·l, 1992, 1994). Ambdós sucres, fru-1P i fru-6P, s'uneixen a un lloc específic en la GKRP (Veiga-da-Cunha i Van Schaftingen, 2002) (figura 5).

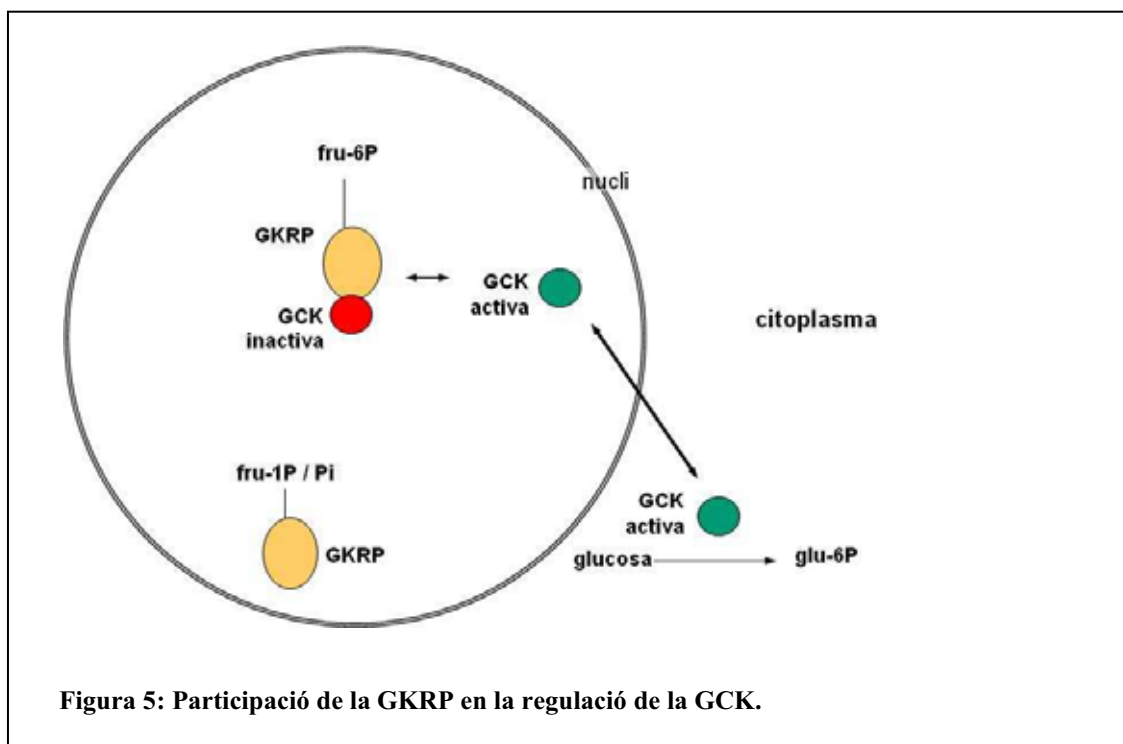


Figura 5: Participació de la GKR en la regulació de la GCK.

El KCl (Vandercarmen i Van Schaftingen, 1991) i el P_i (Detheux i col·l, 1991) contraresten també l'acció inhibidora que exerceix la proteïna reguladora sobre la GCK en presència de fru-6P.

El fet que l'activitat de la GCK hepàtica sigui inhibida per una proteïna reguladora que necessita la presència de fru-6P podria representar un mecanisme indirecte d'inhibició de la GCK per acumulació de glu-6P. Una acumulació de glu-6P es traduiria, mitjançant la fosfoglucosa isomerasa, en un increment en la concentració de la fru-6P i en la conseqüent inhibició de l'activitat GCK per acció de la proteïna reguladora.

1.2.6.A.1 Patró d'expressió

En mamífers, la GKR s'expressa majoritàriament en hepatòcits. Existeixen evidències que indiquen que s'expressa en l'hipotàlem (Alvarez i col·l, 2002), en teixit pulmonar (Brown i col·l, 1997) i en intestí, on s'han detectat nivells molts baixos (Tiedge i col·l, 1999). Si bé alguns autors qüestionen la presència de proteïna reguladora a nivell pancreàtic (Brown i col·l, 1997), el missatger corresponent a aquesta proteïna sembla haver estat identificat en cèl·lules β (Becker i col·l, 1996).

A diferència de la GCK de fetge de rata, que comença a expressar-se a partir del 14è dia de vida extrauterina (Iynedjian i col·l, 1987; Bossard i col·l, 1994), la GKR ja és detectable abans del naixement. Els nivells de missatger hepàtic d'aquesta proteïna es redueixen en

situacions de dejuni i de diabetis, malgrat que la disminució és menys accentuada que en el cas de la GCK (Vandercammen i Van Schaftingen, 1993).

En amfibis (*Bufo marinus* i *Xenopus laevis*) i rèptils (*Pseudemys scripta* subsp. *elegans*) s'ha descrit l'existència d'una proteïna que inhibeix la GCK competitivament en relació a la glucosa però que és insensible a fru-6P i fru-1P (Vandercammen i Van Schaftingen, 1993; Veiga da Cunha i col·l, 1994). Aquests autors no detecten proteïna reguladora a cervell, cor, múscul esquelètic o ronyó de rata ni tampoc a fetge de truita. S'ha suggerit que la GKRP no existeix en peixos (Vandercammen i Van Schaftingen, 1993).

1.2.6.A.2. Funcions de la proteïna reguladora de la GCK

La GKRP participa en la regulació de la localització subcel·lular *in vivo*, de l'estabilitat, i l'activitat de la GCK hepàtica (Van Schaftingen, 1989; Vandercammen i Van Schaftingen, 1990; de la Iglesia i col·l, 1999; Shiota i col·l, 1999; Van Schaftingen i Veiga da Cunha, 2004).

- **Localització subcel·lular**

La compartimentalització de la GCK està regulada per la concentració de glucosa extracel·lular i per substrats que puguin alterar la concentració de fru-1P en hepatòcits. En condicions de dejuni o en hepatòcits en cultiu amb baixa concentració de glucosa (Toyoda i col·l, 1994; Agius i col·l, 1995; Brown i col·l, 1997; Fernández-Novell i col·l, 1999), la GCK és segrestada en estat inactiu en el nucli a través de la interacció amb la GKRP. Aquesta proteïna s'uneix a fru-6P per actuar com a inhibidor de l'activitat enzimàtica de la GCK. La GCK es transloca al citoplasma quan els hepatòcits s'incubem amb concentració elevada de glucosa o en animals alimentats (Vandercammen i van Schaftingen, 1993; Nordlie i col·l, 1999; De la Iglesia i col·l, 1999; Farrelly i col·l, 1999; Shiota i col·l, 1999; Van Schaftingen i Veiga da Cunha, 2004). La translocació de GCK s'afavoreix per la presència de fru-1P, precursors d'aquest metabolit i insulina (Brown i col·l, 1997; Toyoda i col·l, 1994; Agius L., 1998). En hepatòcits, el glucagó contraresta els efectes de la glucosa i fru-1P en la translocació de la GCK del nucli cap al citoplasma (Agius i Peak, 1993; Brown i col·l, 1997).

No s'ha identificat en la seqüència de la GCK cap senyal de localització nuclear (NLS) (Nigg i col·l, 1997) que pogués contribuir a explicar la migració cap al nucli efectuada per aquest enzim (Shiota i col·l, 1999). El fet de no contenir NLS incapacita a la GCK per migrar per si sola al nucli, per tant, la GKRP és necessària per a la translocació de la GCK al nucli (Shiota i col·l, 1999; Bosco i col·l, 2000). Pel contrari, la GCK conté una senyal d'exportació nuclear (NES) que capacita a la GCK per migrar al citoplasma una vegada es dissocia de la GKRP present en el nucli (Shiota i col·l, 1999).

La seqüència NES facilita el transport ràpid de molècules grans del nucli al citoplasma (Ullman i col·l, 1997). El senyal esmentat inclou els aminoàcids E³⁰⁰LVRLVLLKLV³¹⁰ i justifica que, en absència de GKRP, la GCK hepàtica de rata es localitzi al citosol (Shiota i

col·l, 1999). La unió de GCK a la proteïna reguladora podria donar lloc a un emmascarament del NES que asseguraria que la GCK no és exportada del nucli cap al citosol fins que no s'allibera de la unió a la proteïna reguladora.

En rates obesas diabètiques (Zucker), que presenten una inadequada disminució de la producció endògena de glucosa i un defecte en la recaptació hepàtica de glucosa, s'ha observat una pèrdua de translocació de la GCK del nucli al citoplasma, en canvi no s'ha detectat una alteració de l'expressió de la GCK en hepatòcits (Fujimoto i col·l, 2004). Recentment, s'ha descrit que la pèrdua de translocació de la GCK al citoplasma en estats d'hiperglicèmia és deguda a un defecte en la dissociació del complex GCK-GKRP (Shin i col·l, 2007).

Mutants de la GCK hepàtica que presenten una afinitat disminuïda per la GKRP no migren cap al nucli, ni tan sols quan les concentracions de glucosa són molt baixes (de la Iglesia i col·l, 1999). En ratolins *knockout* per GKRP, la GCK es localitza exclusivament en citoplasma (Farrelly i col·l, 1999). La presència de la proteïna reguladora és essencial per a la correcta localització subcel·lular de la GCK.

Alguns autors assenyalen que tant la GCK com la GKRP estan presents en el citoplasma (Van Schaftingen i col·l, 1992; Cardenas i col·l, 1995). Pel contrari, altres estudis demostren que la GKRP es manté sempre en el nucli (Agius i col·l, 1995; Brown i col·l, 1997; de la Iglesia i col·l, 1999; Fernández-Novell i col·l, 1999; Farrelly i col·l, 1999). D'altra banda, Toyoda i col·l (1994, 1995) descriuen que tant la GCK com la GKRP són capaces de translocar-se en situació d'hiperglicèmia. Un estudi de Reitz i Pagliaro (1997) demostra que la GKRP s'uneix als microfilaments d'actina, de manera que, el complex GCK-GKRP podria estar associat al citoesquelet cel·lular. Mukhtar i col·l (1999) també són partidaris de la migració de la GKRP al citosol durant la realimentació o en presència d'elevada concentració de glucosa.

- **Inhibició de l'activitat de la GCK hepàtica**

La GKRP inhibeix l'activitat de la GCK hepàtica de rata de manera competitiva en relació a la glucosa, ja que incrementa la K_m per aquest substrat sense afectar la $V_{m\grave{a}x}$. Aquesta proteïna interacciona en un lloc diferent del centre catalític de l'enzim (Vandercammen i Van Schaftingen, 1991).

La GKRP de rata inhibeix també les GCK hepàtiques de porc i de *Xenopus laevis*. No inhibeix, en canvi, les HK I-III, ni la GCK de baixa K_m de *Bacillus stearothermophilus* (Vandercammen i Van Schaftingen, 1991).

- **Estabilitat de la GCK**

La unió de GKRP a GCK pot actuar com a protecció de l'enzim front a la degradació a la que es veuria exposat si romangués en el citosol. La unió GCK-GKRP actuaria com a reservori de l'enzim, en el nucli, que pot ser mobilitzat ràpidament després de l'alimentació

(Farrelly i col·l, 1999; Grimsby i col·l, 2000). Cal assenyalar que la isoforma pancreàtica de la GCK, que aparentment no és regulada per la mateixa proteïna reguladora, té un temps de vida mitja molt més curt que la GCK de fetge.

- **Homeòstasi de glucosa**

La GGRP presenta un paper important en la regulació del flux metabòlic en fetge. Mitjançant la unió i inhibició reversible de la GCK, la GGRP és capaç d'afectar a la utilització de glucosa i a la sensibilitat dels hepatòcits a canvis en la concentració de glucosa (de la Iglesia i col·l, 2000).

La separació física de la GCK del compartiment on té lloc la formació de glucosa en condicions de gluconeogènesi presenta una implicació metabòlica important. En estats de dejuni o postabsortius, tant la glucogenolisi com la gluconeogènesi proporcionen glu-6P citosòlica destinada a ser alliberada al torrent sanguini, després d'haver estat hidrolitzada a glucosa per intervenció de la G6PC. El fet que, en aquestes circumstàncies, la GCK es trobi localitzada majoritàriament al nucli assegura que la glucosa generada no torni a ser fosforilada i enviada cap a la glucòlisi o la glucogenogènesi, fet que representaria una pèrdua inútil d'energia. En estats absortius, en canvi, la GCK es troba localitzada al citosol i pot anar fosforilant la glucosa a mesura que aquesta arriba al fetge per ser metabolitzada (Toyoda i col·l, 1994).

La GGRP constitueix un sistema sensor de fructosa. La fructosa pot actuar com a senyal nutricional afavorint la utilització de glucosa (Topping i col·l, 1976; Clark i col·l, 1979; Van Schaftingen i col·l, 1989b, 1991, 1994; Fillat i col·l, 1993; Shiota i col·l, 2002). Per tant, petites quantitats de fructosa en la dieta podrien millorar el tractament de la diabetis tipus 2 (Watford M., 2002).

L'absència de GGRP en ratolins transgènics (Farrelly i col·l, 1999) condueix a un desequilibri en el control de la glicèmia que s'evidencia per la disminució dels nivells de glicogen i l'increment de l'expressió de PEPCCK. D'altra banda, en aquests ratolins la disminució de l'expressió de la GCK hepàtica es compensa gràcies a l'absència dels efectes inhibidors causats per la proteïna reguladora sobre la GCK (Grimsby i col·l, 2000).

La regulació per GGRP permet que el metabolisme hepàtic de la glucosa es posi en marxa ràpidament en situacions de realimentació després d'un període de dejuni, ja que només implica que la GCK sigui transportada del nucli al citosol de l'hepatòcit (Farrelly i col·l, 1999; Grimsby i col·l, 2000).

1.2.6.B. Àcids grassos de cadena llarga

La GCK hepàtica de rata és inhibida de forma específica pel palmitoil-CoA i altres acils-CoA de cadena llarga. La inhibició és de tipus reversible i competitiu, tant en relació a la glucosa com en relació a l'ATP, i té lloc sense afectar la cooperativitat de la GCK per a la glucosa, ja que el coeficient de Hill es manté constant en tots els estudis d'inhibició (n=1,5)

(Tippett i col·l, 1982a). Com en el cas de la GKR, la inhibició observada per acció de l'acil-CoA es produeix per unió a un lloc al·lostèric de l'enzim. La unió de l'acil-CoA promou un canvi conformacional que redueix l'afinitat de GCK per glucosa i ATP, sense afectar la V_{\max} de la reacció (Tippett i col·l, 1982b). Només palmitoil-CoA i esteroil-CoA semblen reunir les característiques cinètiques adients per dur a terme la inhibició de l'activitat GCK a nivell fisiològic.

La inhibició de l'activitat GCK pels acils-CoA podria ser considerada com una via de control del metabolisme de la glucosa i de la formació de glucogen per part dels productes del metabolisme dels àcids grassos. D'aquesta manera, en situacions de dejuni o de diabetis, quan la lipòlisi està incrementada, aquest mecanisme podria contribuir a impedir la captació de glucosa del torrent sanguini.

1.2.6.C. Inhibició de l'activitat GCK per *N*-acetilglucosamina

S'ha descrit que la *N*-acetilglucosamina actua com a inhibidor competitiu de l'activitat GCK hepàtica en mamífers (Parry i col·l, 1966). L'acció d'aquest inhibidor és sinèrgica amb la de la GKR (Vandercammen i Van Schaftingen, 1991). La GCK hepàtica d'*Sparus aurata* és més sensible a la inhibició per *N*-acetilglucosamina que l'enzim de rata (Caseras i col·l, 2000). Tranulis i col·l (1996) també observen un efecte pronunciat de la *N*-acetilglucosamina sobre l'activitat GCK de fetge de salmó.

1.2.6.D. Activadors al·lostèrics de la GCK (GKA)

Recentment, s'han descobert molècules que actuen com a activadors al·lostèrics de la GCK (Grimsby i col·l, 2003; Efanov i col·l, 2005; Sarabu i Grimsby, 2005). Els estudis realitzats revelen que aquests activadors condueixen a un augment de l'afinitat de la GCK per la glucosa i de la V_{\max} , de manera que augmenta el metabolisme hepàtic de la glucosa i la secreció d'insulina induïda per glucosa per part dels illots pancreàtics (Grimsby i col·l, 2003, 2004). Els GKA disminueixen els nivells de glucosa i milloren els resultats dels tests de tolerància a glucosa en rosegadors amb diabetis tipus 2. La disponibilitat d'aquestes molècules poden conduir al desenvolupament de noves teràpies per al tractament de la diabetis (Matchinsky i col·l, 2006).

Recentment s'ha cristal·litzat la GCK d'humans amb o sense GKA (Kamata i col·l, 2004) (estructures il·lustrades a la figura 2). Futamura i col·l (2006) han descrit l'existència d'un altre activador al·lostèric que és capaç de reduir la glucèmia incrementant l'alliberació d'insulina per part dels illots pancreàtics i augmentant la metabolització de la glucosa. En fetge, aquest activador actua incrementant l'activitat catalítica de la GCK i induint-ne la translocació. El compost s'uneix només a la forma activa de la GCK lliure en el citoplasma, estabilitzant així l'estat actiu d'aquesta, de manera que inhibeix l'associació entre GCK i GKR.

1.2.6.E. Unió a altres proteïnes i orgànuls cel·lulars

A més de la GKR, s'han descrit altres proteïnes que poden unir-se a la GCK, com és el cas de la fosfatasa dual-específica, anomenada GKAP (Muñoz-Alonso i col·l, 2000), l'enzim bifuncional PFKFB1 (Baltrusch i col·l, 2001, 2004; Massa i col·l 2004), i el factor proapoptòtic Bad (Danial i col·l, 2003).

Payne i col·l (2005) suggereixen que la PFKFB1 presenta un doble paper en el control de la GCK en hepatòcits: potencia l'expressió proteica de GCK, i afavoreix la compartimentalització citoplasmàtica de la GCK, actuant com a mecanisme complementari de la GKR. La primera evidència directa de la unió de PFKFB1 a GCK ha estat descrita recentment (Smith i col·l, 2007). La formació del complex PFKFB1-GCK promou l'activació de GCK i PFK, mentre que FBP1 no varia, resultant en l'activació de la via glucolítica.

S'ha suggerit l'associació de GCK a mitocondria (Vanhoutte i col·l, 1997, 1998). Aquesta associació podria produir-se a través de la interacció amb el complex multi-proteic que implica el factor Bad (Danial i col·l, 2003). El paper de la GCK associada a mitocondria en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa fou suggerit en base a la hiperglicèmia observada en ratolins Bad $-/-$, que mostren una disminució de GCK en mitocondria. Pel contrari, Bustamante i col·l (2005) indiquen que la GCK no està present en mitocondries hepàtiques de ratolí. Recentment, s'ha confirmat l'associació de GCK amb mitocondria en fetge de rata i s'ha descrit l'existència de canvis adaptatius de la relació GCK/GKR, la qual cosa suggereix un paper fisiològic per a l'associació de GCK a mitocondria (Arden i col·l, 2006).

D'altra banda, s'ha observat que la GCK de cèl·lules β -pancreàtiques podria estar associada a grànuls d'insulina (Toyoda i col·l, 1999; Stubbs i col·l, 2000; Rizzo i col·l, 2002). La unió a grànuls d'insulina està incrementada quan els nivells de glucosa són baixos, i resulta bloquejada per inhibidors de la secreció d'insulina. Quan la concentració de glucosa augmenta, la GCK es transloca al citoplasma (Rizzo i col·l, 2002, 2003). L'associació de GCK amb grànuls d'insulina sembla ser un mecanisme per protegir l'enzim de la degradació (Toyoda i col·l, 1999; Stubbs i col·l, 2000), semblant a l'exercit per la GKR en hepatòcits (Farrelly i col·l, 1999). Pel contrari, alguns autors descriuen que la GCK pancreàtica no canvia de localització (Stubbs i col·l, 2000; Arden i col·l, 2004).

L'activitat de la GCK pancreàtica es modula en resposta a glucosa per un factor proteic que sembla ser diferent de la GKR identificada a nivell hepàtic (Tiedge i col·l, 1999). Shiraishi i col·l (2001) van detectar que el precursor de la subunitat β de la propionil-CoA carboxilasa (p β PCCasa), enzim dependent de biotina, interacciona amb la GCK pancreàtica. Aquesta proteïna activa la GCK promovent un augment en la $V_{m\grave{a}x}$ i una disminució de la K_m . La p β PCCasa està implicada directament en la regulació del metabolisme de glucosa i en la secreció de glucosa induïda per insulina en illots pancreàtics (Shiraishi i col·l, 2001).

En cèl·lules β -pancreàtiques la interacció amb la PFKFB pot ser un element indispensable per assegurar la funció de GCK pancreàtica com a sensor de glucosa lligat a la secreció d'insulina (Massa i col·l, 2003, 2004).

1.2.7. EFECTES METABÒLICS DE LA SOBREEXPRESSIONI I DE LA SUPRESSIÓ DEL GEN *GCK*

1.2.7.A. Sobreexpressió de *GCK*

Niswender i col·l (1997a) generaren ratolins transgènics amb còpies addicionals del gen sencer *GCK*. Els nivells de missatge, proteïna i activitat de *GCK* hepàtica es troben incrementats proporcionalment al nombre de còpies del transgen presents al genoma. A més, l'expressió del transgen es modula en condicions de dejuni i realimentació (Niswender i col·l, 1997a). En aquest model experimental, la sobreexpressió de *GCK* condueix a una disminució de la concentració plasmàtica de glucosa, sense que s'incrementi la síntesi de glucogen o que es redueixi la glucogenolisi. La reducció de la glucèmia sembla provenir d'una estimulació general del metabolisme hepàtic de la glucosa, ja que els nivells de secreció d'insulina no es veuen modificats. D'acord amb aquestes observacions, els animals transgènics presenten un increment en l'expressió de L-PK, com també una disminució dels nivells d'mRNA que codifiquen per a PEPCCK, situació que afavoreix la glucòlisi (Niswender i col·l, 1997b).

Tant en animals tractats amb estreptozotocina, com en animals alimentats amb dietes riques en greix, la sobreexpressió de *GCK* protegeix contra el desenvolupament de la diabetis (Ferre i col·l, 1996; Desai i col·l, 2001; Shiota i col·l, 2001). Aquestes dades suggereixen que l'increment d'activitat *GCK* pot exercir un paper terapèutic en el tractament de la diabetis tipus 2. Altres estudis mostren que una elevada sobreexpressió de *GCK* (de l'ordre de sis vegades) a fetge de rata condueix a un increment important en les concentracions d'àcids grassos lliures i de triglicèrids circulants, fet que qüestiona el paper de *GCK* com a eina terapèutica per contrarestar la diabetis. Aquests experiments indiquen que només s'aconsegueix una reducció de les concentracions plasmàtiques de glucosa i d'insulina en rates alimentades, quan la sobreexpressió de la *GCK* a fetge assoleix uns nivells que provoquen també un increment en els nivells d'àcids grassos lliures i triglicèrids circulants (O'Doherty i col·l, 1999). Com a conseqüència de la sobreexpressió de *GCK*, es produeix un increment de la concentració de glicerol-3P i de malonil-CoA; atès que aquest últim metabòlit és un inhibidor de l'enzim carnitina palmitoiltransferasa 1, es produiria en aquestes condicions una inhibició de l'oxidació dels àcids grassos, que es dirigiria llavors cap a la síntesi de triglicèrids i de VLDL. Addicionalment, la reducció dels nivells d'insulina afavoreix la lipòlisi del teixit adipós. Posteriorment, s'ha descrit que la sobreexpressió moderada de la *GCK* (de l'ordre de tres vegades), no causa dislipidèmia i resulta en un increment de PK i acetil-coA carboxilasa (Scott i col·l, 2003).

1.2.7.A.1 Sobreexpressió de *GCK* a fetge

La sobreexpressió estable de *GCK* en fetge s'ha aconseguit mitjançant la obtenció de ratolins transgènics (Ferré i col·l, 1996; Hariharan i col·l, 1997). En ratolins transgènics que expressen el gen *GCK* sota el control del promotor de la *PEPCCK*, s'han detectat nivells

importants d'expressió de *GCK* hepàtica en situacions de dejuni (Ferre i col·l, 1996a) i de diabetis (Ferre i col·l, 1996b). En aquest model experimental, la hiperglicèmia diabètica tendeix a veure's contrarestada, fins i tot en absència d'insulina, gràcies a una inducció de la glucòlisi i a una aturada en la gluconeogènesi i la cetogènesi. Així mateix, en ratolins transgènics que sobreexpressen la *GCK* hepàtica humana, s'ha apreciat un increment en la tolerància a la glucosa i una pèrdua de pes relacionada amb nivells plasmàtics baixos de glucosa i d'insulina (Hariharan i col·l, 1997).

El tractament amb adenovirus per sobreexpressar la *GCK* hepàtica comporta un increment general del metabolisme, tant en hepatòcits primaris de rata (O'Doherty i col·l, 1996) com en hepatòcits de rates diabètiques Zucker (Seoane i col·l, 1999). En aquestes condicions, s'estimula la utilització de glucosa i la producció de lactat. Només la glu-6P produïda per acció de *GCK* és capaç de promoure l'activació de la glucogen sintasa i d'estimular la síntesi de glucogen. En canvi, la glu-6P produïda tant per la *GCK* com per la HKI és encaminada amb la mateixa eficiència cap a la glucòlisi (Seoane i col·l, 1996).

1.2.7.A.2. Sobreexpressió de *GCK* a pàncrees

Inicialment, es va descriure que la sobreexpressió de *GCK* en illots pancreàtics mitjançant adenovirus no produïa un gran impacte en la glucòlisi ni en l'alliberament d'insulina (Becker i col·l, 1996).

Estudis posteriors suggereixen que l'escàs impacte metabòlic observat per Becker i col·l (1996) en sobreexpressar la *GCK* en cèl·lules β , podria ser degut a la utilització d'un promotor que condueix a nivells molt elevats de sobreexpressió. Una sobreexpressió molt accentuada de *GCK* en cèl·lules d'insulinoma dona lloc a la pèrdua de control de la glucòlisi en l'etapa catalitzada per aquest enzim (Wang i col·l, 1997a).

La sobreexpressió gradual de *GCK* en cèl·lules d'insulinoma demostra que, a baixa concentració de glucosa, qualsevol increment en l'expressió de *GCK* es correlaciona amb un increment en la utilització de glucosa, confirmant així el paper regulador de la *GCK* pancreàtica en la glucòlisi. A concentracions elevades de glucosa, en canvi, els increments de l'activitat *GCK* ja no es corresponen amb increments de la glucòlisi i, per tant, algun altre enzim de la via exerceix un paper limitant. Per altra banda, la sobreexpressió de *GCK* afavoreix tant l'expressió gènica com la secreció d'insulina, i evidencia que la presència de *GCK* és el determinant que desencadena ambdós processos (Wang i col·l, 1997b).

1.2.7.B. Supressió de *GCK*

Els estudis de pèrdua de funció de *GCK* han estat realitzats suprimint l'expressió d'aquest gen (Grupe i col·l, 1995; Bali i col·l, 1995; Postic i col·l, 1999).

Els animals deficientes en *GCK* es veien afectats de diabetis severa i morien als pocs dies de vida. En canvi, els animals heterozigots sobreviuen, malgrat presentar hiperglicèmies moderades com a conseqüència d'una hipoinsulinèmia en resposta a glucosa; en aquests

animals, el metabolisme hepàtic es veia limitat per la manca d'insulina. Aquestes alteracions són equiparables a les observades en cas de la MODY (Bali i col·l, 1995).

1.2.7.B.1 Supressió de *GCK* a fetge

Els ratolins amb supressió de *GCK* hepàtica mostren un lleu increment de la glicèmia però són viables. En hiperglicèmies sostingudes presenten alteracions importants en la síntesi de glucogen, en la utilització de glucosa i en la secreció d'insulina en resposta a la glucosa (Postic i col·l, 1999). Laybutt i col·l (2002) indiquen que una hiperglicèmia lleu però crònica podria causar una alteració en l'expressió de gens implicats en múltiples vies metabòliques. El fenotip deficient en *GCK* hepàtica és semblant al d'animals que són deficients en GKRP (Farrelly i col·l, 1999; Grimsby i col·l, 2000).

1.2.7.B.2 Supressió de *GCK* a pàncrees

Terauchi i col·l (1995) varen generar ratolins deficients en l'expressió de la isoforma pancreàtica, i en els que l'expressió de la *GCK* hepàtica no s'alterava. Aquests ratolins presenten un fenotip idèntic al que expressen ratolins deficients del gen sencer (Postic i col·l, 1999). Els ratolins heterozigòtics per a la mutació mostren una diabetis lleugera, sense variacions en els nivells basals d'insulina. Mentre que els ratolins homozigots a nivell pancreàtic mostren una disminució del contingut del glicogen hepàtic, una disminució del 70 % de concentració d'insulina plasmàtica i moren després de pocs dies com a resultat d'una diabetis severa.

La supressió de la *GCK* pancreàtica confirma el paper clau d'aquest enzim com a sensor dels nivells de glucosa (Piston i col·l, 1999).

Aquests estudis amb models animals amb alteracions en l'expressió de *GCK* mostren que tant la *GCK* hepàtica com la pancreàtica són importants i presenten papers complementaris en el manteniment de la glucèmia. Existeix una relació inversament proporcional entre la quantitat de *GCK* i la concentració de glucosa en sang. Petites alteracions en la quantitat de *GCK* alteren el metabolisme de glucosa causant canvis en la glucèmia.

En situacions de sobreexpressió de *GCK*, el fetge sembla jugar un paper més important en la disminució de la glucèmia. En canvi, en situació de supressió de *GCK*, sembla que la carència de *GCK* en cèl·lules β -pancreàtiques té un efecte fisiològic dominant en relació amb el desequilibri en la secreció d'insulina en resposta a glucosa. Aquests estudis subratllen la importància de la *GCK* hepàtica en l'establiment de la diabetis tipus 2.

1.3. PROTEÏNES Sp1-LIKE O KRÜPPEL-LIKE FACTORS (KLFs)

Sp1 (*Specificity Protein 1*) fou un dels primers factors de transcripció purificat i clonat parcialment a partir de cèl·lules HeLa (Dynam i Tjian, 1983a,b; Kadonaga J.T. i col·l, 1987, 1988). Posteriorment, s'identificaren altres factors de transcripció que tenien motius de dits de zinc semblants a Sp1. D'aquesta manera, es va definir la classe de proteïnes KLFs. Els membres d'aquesta família han adquirit al llarg del temps múltiples nomenclatures, que han estat revisades i estandaritzades (Bouwman i Philipsen, 2002).

Les proteïnes Sp1-like/KLF estan presents en una gran varietat d'espècies, des de nemàtodes (*Caenorhabditis elegans*) fins a humans (Brown i col·l, 1996; Wimmer i col·l, 1993). Existeixen 21 proteïnes de la família Sp1-like/KLF en humans, s'han identificat 17 proteïnes homòlogues en ratolí, i 11 en rata. En espècies de peixos, com *Dario rerio*, s'han detectat alguns membres d'aquesta família (Baudler i col·l, 1997; Oates i col·l, 2001; Zhao i col·l, 2003).

Els factors de la família Sp1-like/KLF poden reconèixer regions de DNA amb caixes GC-(GGGGCGGG) i GT-(GGTGTGGG) i regular-ne la transcripció. Les caixes GC i GT són elements reguladors importants en l'expressió de molts gens, tant constitutius com induïbles (Philipsen i Suske, 1999; Li i col·l, 2004).

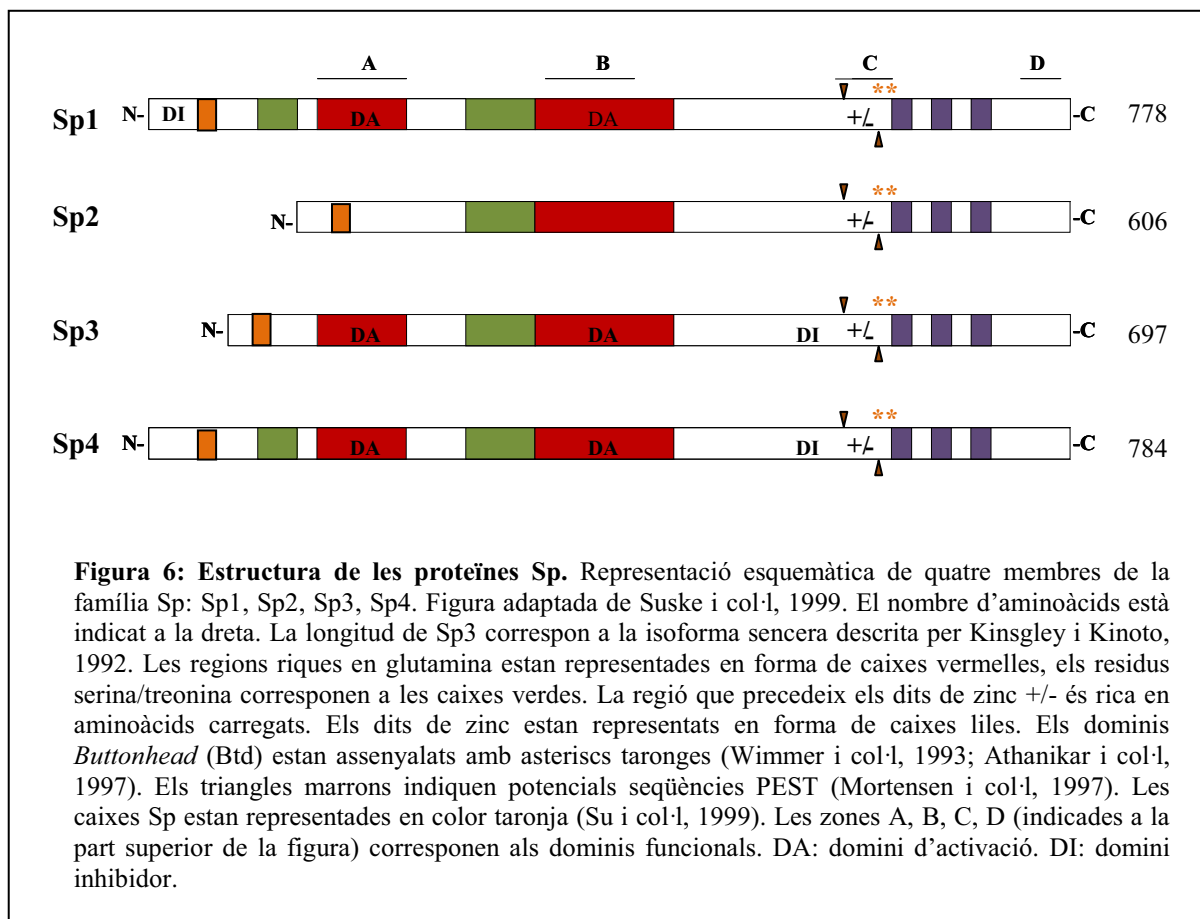
Dintre de la família Sp1-like/KLF, s'han descrit diferents grups en base a les similituds en seqüència i funció. Els factors més relacionats amb Sp1 formen un subgrup anomenat proteïnes Sp o subgrup I, que conté les proteïnes Sp1-Sp8. La resta de proteïnes Sp1-like/KLF formen dos subgrups addicionals (subgrup II i subgrup III). D'acord a les regles de la nova nomenclatura, aquestes proteïnes foren anomenades com factors KLF (KLF1-KLF16), (Kaczynski i col·l, 2003).

Aquestes proteïnes presenten 3 dominis: domini d'unió a DNA, de senyalització de localització nuclear, i domini de regulació transcripcional. Entre els diferents membres de la família existeix una elevada homologia en el domini d'unió a DNA. Concretament, en l'extrem C-terminal, que conté tres motius de dits de zinc Cys₂His₂ en tàndem. Els dits de zinc poden participar, a part de la interacció amb el DNA, en interaccions proteïna-proteïna que poden modular l'especificitat d'unió a DNA. La regió N-terminal és més variable i conté els dominis d'activació o repressió transcripcional. Les proteïnes Sp1-like/KLF estan implicades en processos de regulació del creixement o desenvolupament. Totes semblen estar implicades en les vies morfogènètiques; algunes juguen un paper important en la fisiologia de les cèl·lules de mamífers, mentre que d'altres semblen tenir una funció més restringida a un tipus cel·lular específic (Kaczynski i col·l, 2003).

1.3.1. FAMÍLIA DE PROTEÏNES Sp

Tal com s'ha mencionat, Sp1 fou el primer membre clonat dels factors Sp (Kingsley i Winoto, 1992; Hagen i col·l, 1994, 1995; Harrison i col·l, 2000; Scohy i col·l, 2000; Nakashima i col·l, 2002; Bouwman i Philipsen, 2002). Entre els factors Sp, Sp1-4 formen un subgrup que difereixen de Sp5-8, principalment, en la regió N-terminal. Els factors de transcripció Sp1-4 presenten un paper important en diversos processos fisiològics incloent la regulació del cycle cel·lular, activació hormonal, apoptosi i angiogènesi, entre d'altres. Les proteïnes d'aquest subgrup comparteixen dominis funcionals que estan ben conservats: el domini d'activació transcripcional N-terminal, i el domini de dits de zinc d'unió a DNA en la regió C-terminal (Courey i col·l, 1989; Courey i Tjian, 1998; Pascal i Tjian, 1991) (Figura 6).

Les característiques funcionals dels factors Sp, tot i l'elevat grau d'homologia, es superposen parcialment. La funcionalitat en la regulació transcripcional pot estar altament controlada per les condicions cel·lulars, el context del promotor i les característiques bioquímiques dels factors (Suske G., 1999).



1.3.1.A. Sp1

Originàriament, el factor Sp1 es va identificar com un factor de transcripció que reconeixia i s'unia específicament a caixes GC del promotor del virus SV40 via tres dits de zinc i activava *in vitro* la seva transcripció (Dynan i Tjian, 1983b; Gidoni i col·l, 1984, 1985). Actualment, estan clonats els cDNA que codifiquen per a Sp1 de ratolí i rata (Imataka i col·l, 1992; Yajima i col·l, 1998). Posteriorment, es va clonar el promotor del gen Sp1 (Nicolás i col·l, 2001).

1.3.1.A.1 Estructura

Sp1 és una proteïna de 778 aminoàcids i pes molecular de 105 kDa (Briggs i col·l, 1986; Kadonaga i col·l, 1987). Està format per dos dominis de transactivació A i B, rics en glutamina, essencials per a l'activació transcripcional, que poden actuar com a dominis altament activadors (figura 6) (Courey i Tjian, 1988). Posteriorment, s'ha indicat que els aminoàcids hidrofòbics d'aquests dominis són essencials per a la transactivació, i no els residus de glutamina (Gill i col·l, 1994). Les seqüències riques en serines/treonines podrien estar implicades en les modificacions postraduccionals de la proteïna. Al costat dels tres dits de zinc tots els Sp contenen el domini C que inclou una caixa anomenada *Buttonhead* (Btd) (Wimmer i col·l, 1993). Aquest element és important per a l'activitat de transactivació i està implicat en l'activació sinèrgica d'Sp1 amb els factors de transcripció SREBP (Yieh, i col·l, 1995; Athanikar i col·l, 1997). En aquesta regió també s'ha descrit l'existència de seqüències PEST, que són motius potencials per a la inducció de proteòlisi (Mortensen i col·l, 1997). A continuació i entre els 168 aminoàcids de l'extrem C-terminal, estan localitzats els dits de zinc, que formen el domini d'unió a DNA. En l'extrem C-terminal se situa el domini D, important per al funcionament dels dominis de transactivació A i B, i per a l'activació sinèrgica de promotors a través de Sp1 (Pascal i Tjian, 1991).

A l'extrem N-terminal de les proteïnes Sp (excepte Sp7) està situada una altra regió d'aminoàcids conservats que formen la seqüència: SPLALLAATCSR/KI (caixa Sp). Aquest element conté un lloc que és diana de degradació proteosòmica *in vitro* (Su i col·l, 1999; Harrison i col·l, 2000). El fet de què la caixa Sp estigui altament conservada indica que podria tenir un paper important en la regulació de la proteòlisi dels factors Sp. Una altra possible funció d'aquesta caixa s'atribueix al control de la transactivació mitjançant interacció amb un possible repressor (Murata i col·l, 1994).

1.3.1.A.2 Anàlisi funcional

Inicialment es va descriure que Sp1 actuava com a factor activador de la transcripció basal de gens constitutius, en particular, d'aquells que no contenen caixa TATA (Pugh i col·l, 1991). Actualment, es coneix que aquest factor està implicat en l'activació transcripcional de gens específics de teixit i gens reguladors del cicle cel·lular, i és necessari per a la prevenció de la metilació dels illots CpG (Brandeis i col·l, 1994; Macleod i col·l, 1994; Suske G., 1999;

Samson i Wong, 2002; Pang i col·l, 2004; Suske i col·l, 2005). S'ha descrit que Sp1 juga un paper important en la regulació d'enzims glicolítics (Hermfisse, 1996; Netzker, 1997; Scháfer, 1996; Hamm-Kunzelmann, 1997; Griffith i col·l, 1999).

Sp1 és una proteïna d'expressió ubiqua que s'expressa àmpliament en diferents teixits. L'expressió d'Sp1 difereix en funció dels tipus cel·lulars durant el desenvolupament, i disminueix en cèl·lules completament diferenciades (Saffer i col·l, 1991). El *knockout* del gen que codifica per Sp1 dona lloc a defectes morfològics en etapes primerenques del desenvolupament (Marin i col·l, 1997). Podria esperar-se que cèl·lules deficientes en Sp1 no sobrevisquessin. Sorprenentment, això no succeeix, però els embrions de ratolí Sp1-*knockout* estan retardats en quant al desenvolupament i moren aproximadament al dia 11 de la gestació. Així doncs, Sp1 sembla ser un factor essencial per a cèl·lules diferenciades després de 10 dies de desenvolupament. De manera equivalent, s'ha demostrat que proteïnes homòlogues a Sp1 són de vital importància pel creixement en el cas de *Drosophila* i *Xenopus* (Wimmer i col·l, 1993; Ossipova i col·l, 2002).

Sp1 s'uneix a caixes GC de promotors, i actua estimulando la transcripció de promotors proximals o distals (Courey i col·l, 1989). Sp1 també pot actuar com a repressor transcripcional, com és en el cas de la interacció amb la histona desacetilasa I (HDAC1), (Doetzelhofer i col·l, 1999).

S'han descrit un gran nombre d'interaccions heterotípiques entre Sp1 i diferents classes de proteïnes nuclears. Aquestes inclouen els factors que pertanyen a la maquinària basal de transcripció. Sp1 pot interaccionar directament amb la proteïna d'unió a la caixa TATA (TBP) (Emili i col·l, 1994) i amb els factors d'associació a TBP (dTAFII110/hTAFII130) a través dels dominis A i B (Hoey i col·l, 1993; Gill i col·l, 1994; Tanese i col·l, 1996), i amb hTAFII55 a través del domini C terminal (Chiang i Roeder, 1995). En gens mancats de caixa TATA, Sp1 podria estar implicat en el reclutament de factors iniciadors de la transcripció sobre el promotor (Smale i col·l, 1990).

Adicionalment, Sp1 interacciona amb proteïnes reguladores del cicle cel·lular, com la proteïna relacionada amb el retinoblastoma (p107) (Datta i col·l, 1995; Udvadia i col·l, 1995; Noé i col·l, 1998), p53 (Gualberto i Baldwin, 1995), factors de transcripció, com E2F (Karlseder i col·l, 1996; Lin i col·l, 1996), GATA-1 (Merika i col·l, 1995), Oct-1 (Strom i col·l, 1996), i NF- κ B (Perkins i col·l, 1993; Pazin i col·l, 1996). Sp1, C/EBP β i HMGI-Y (membre de *High-Mobility Group protein family*) interaccionen *in vivo* i *in vitro* amb el promotor del gen que codifica per al receptor d'insulina humana, i actuen transactivant-lo (Foti i col·l, 2003). No només Sp1, sino també Sp2, Sp3 i Sp4 poden interaccionar físicament amb E2F-1 (Rotheneder i col·l, 1999). Sp1 és capaç de formar interaccions homotípiques donant lloc a complexes multimèrics (Mastrangelo i col·l, 1991; Pascal i Tjian, 1991; Su i col·l, 1991).

1.3.1.A.3. Regulació d'Sp1

Sp1 pot ser regulat per: insulina, lipopolisacàrids, AMPc, hiperglicèmia, factors de transcripció i pot ser autoregulat positivament (Merchant i col·l, 1995; Venepally i col·l, 1995; Han i col·l, 1997; Black i col·l, 1999; Goldberg i col·l, 2000; Nicolàs i col·l, 2001, 2003; Ye i col·l, 2002; Majumdar i col·l, 2003).

Gran part d'aquests factors produeixen el seu efecte a través de modificacions post-traduccionals, que poden influir en l'activitat d'Sp1. Els dos tipus de modificacions principals que semblen estar implicades en la regulació d'Sp1 són la glicosilació i la fosforilació (Jackson i Tjian, 1988; Jackson i col·l, 1990; Chu i Ferro, 2005). També s'ha descrit que pot regular-se per acetilació i sumoïlació (Ryu i col·l, 2003; Spengler i Brattain, 2006). Hung i col·l (2006) observen que Sp1 pot ser acetilat en el residu K⁷⁰³ situat en l'extrem carboxi-terminal i que la sobreexpressió de p300 pot incrementar els nivells d'acetilació d'Sp1.

L'O-glicosilació i la fosforilació d'Sp1 modulen l'expressió d'un elevat nombre de gens (Comer i Hart, 2000; Cheng i Hart, 2001; Kamemura i Hart, 2003; Slawson i Hart, 2003; Slawson i col·l, 2005). La insulina estimula la síntesi d'Sp1 i controla la fosforilació i l'O-glicosilació d'Sp1 (Solomon i col·l, 1997; Majumdar i col·l, 2003; Majumdar i col·l, 2004). Majumdar i col·l (2006) mostren que l'O-glicosilació i la fosforilació es produeixen en el nucli cel·lular.

Sp1 és O-glicosilat per unió covalent del monosacàrid N-acetilglucosamina en residus de serina i treonina (Jackson i Tjian, 1988). L'O-glicosilació ha estat relacionada amb la localització nuclear, la interacció amb altres factors (Roos i col·l, 1997), l'estabilitat i/o la potencial transactivació d'Sp1 (Han i Kudlow, 1997). El reconeixement per part de components de la maquinària de transcripció dels residus glicosilats d'Sp1 dona lloc a un increment de la transactivació (Jackson i Tjian, 1988). Baixos nivells de glicosilació disminueixen la unió d'Sp1 a DNA (Kang i col·l, 2003). En cas que la glicosilació es produeixi en l'extrem C-terminal del domini d'activació B d'Sp1, les interaccions entre dTAF(II)110 i Sp1 disminueixen marcadament, disminuint la transactivació tant *in vitro* com *in vivo* (Roos i col·l, 1997; Yang i col·l, 2001).

L'estat de glicosilació pot determinar l'estabilitat d'Sp1 (Han i Kudlow, 1997). Sp1 experimenta una degradació depenent de proteosoma en condicions de dejú o baixa concentració de glucosa i estimulació d'adenilat ciclase. L'inici d'aquest procés podria estar determinat per un estat de baixa glicosilació d'Sp1 (Han i Kudlow, 1997), que predisposaria a ser objecte d'un tall endoproteolític en una regió N-terminal, concretament en la caixa Sp (Su i col·l, 1999).

S'ha observat que la fosforilació d'Sp1 és un factor important en la regulació d'un elevat nombre de gens, a través de la modulació de l'activitat transcripcional o de la unió a DNA (Samson i Wong, 2002). La seqüència primària d'Sp1 conté llocs consens de fosforilació per a moltes quinases (Kreegipuu i col·l, 1999; Merchant i col·l, 1999; Zheng i col·l, 2001). Sp1 pot ser fosforilat en l'extrem N-terminal per una proteïna quinasa depenent de DNA, que incrementa l'activitat d'Sp1 (Jackson i col·l, 1990; Gottlieb i Jackson, 1993). La fosforilació mitjançant la caseïna quinasa II es produeix en l'extrem C-terminal i causa una disminució en la unió a DNA (Armstrong i col·l, 1997). La fosforilació mitjançant la proteïna quinasa A

depenent d'AMPc activa la transcripció depenent d'Sp1, incrementant la unió a DNA i la capacitat de transactivació (Rohlf i col·l, 1997). Existeixen molts estudis que relacionen la fosforilació d'Sp1 amb una disminució de la unió a DNA (Borellini i col·l, 1990; Zhu i Liao, 2000), però la fosforilació també condueix a un increment de la capacitat d'unió a DNA (Haidweger i col·l, 2001; Rafty i Khachigian, 2001).

Alguns autors han demostrat la importància de proteïnes fosfatases cel·lulars en la regulació de l'activitat Sp1, què actuen disminuint la unió del factor de transcripció al DNA (Legget i col·l, 1995; Alroy i col·l, 1999; Merchant i col·l, 1999). La defosforilació d'Sp1 per la proteïna fosfatasa 1 està implicada en l'activació a través de glucosa de l'acetil CoA carboxilasa, aldolasa i PK (Daniel i col·l, 1996a, 1996b; Schafer i col·l, 1997).

La insulina té una elevada influència en la biosíntesi i acumulació d'Sp1, tant en cultiu d'hepatòcits, com en fetge de rates diabètiques (Pan i col·l, 2001). S'ha descrit la presència d'elements GC en gens que responen a insulina, fet que suggereix que Sp1 podria estar implicat en la regulació per insulina de l'activitat gènica (Samson i Wong, 2002). El rol d'Sp1 en la regulació per insulina no és uniforme i depèn de les característiques de cada promotor.

Sp1 pot actuar com a mediador de l'acció d'insulina, per exemple, induint el promotor de l'apolipoproteïna A1 (Murao i col·l, 1998). En altres promotors Sp1 pot contrarestar els efectes de la insulina, com és el cas del promotor de l'àcid gras sintetasa (Fukada i col·l, 1997). L'*O*-glicosilació d'Sp1 és essencial per a l'estimulació a través d'insulina de l'expressió del gen que codifica per a la calmodulina (Majumdar i col·l, 2003). La insulina estimula la transcripció del gen de la calmodulina mitjançant el balanç entre l'*O*-glicosilació i la fosforilació d'Sp1, modulant l'estabilitat, la mobilitat, la compartimentació subcel·lular i l'activitat (Majumdar i col·l, 2004). Paradòxicament, s'ha observat que tant el glucagó com la insulina estimulen l'expressió d'Sp1 de forma depenent de la dosi i del temps, però quan s'addicionen insulina i glucagó conjuntament, el glucagó inhibeix els efectes produïts per la insulina (Keembiyehetty i col·l, 2002). La insulina promou l'*O*-glicosilació d'Sp1, i facilita així la seva translocació al nucli, on serà actiu després de ser seqüencialment deglicosilat i fosforilat. Pel contrari, el glucagó no promou l'*O*-glicosilació d'Sp1.

Recentment, s'ha indicat que Sp1 està implicat en la regulació transcripcional de la leptina en resposta a l'estimulació per insulina en adipòcits de rata (Moreno-Aliaga i col·l, 2007).

Sp1 pot actuar també mitjançant cooperativitat amb altres factors, com és el cas de la resposta a insulina per part del promotor de la calmodulina, en què és necessari la presència d'Sp1 i Sp3 (Solomon i col·l, 1997).

1.3.1.B. Sp2

Sp2 és una proteïna d'expressió ubiqua que manté conservat el domini d'unió a DNA (Kingsley i Winoto, 1992; Philipsen i Suske 1999; Suske G., 1999). Tot i conservar els dits de zinc s'uneix a poques de les seqüències a les que s'uneixen la resta d'Sp i té una baixa capacitat per estimular la transcripció de promotors que són activats per Sp1, Sp3 i Sp4 (Moorefield i col·l, 2004). Sp2 té un sol domini ric en glutamines, mentre que Sp1 té dos dominis que són necessaris per l'activació sinèrgica amb altres factors (Pascal i Tjian, 1991; Suske G., 1999). S'ha descrit que Sp2 s'uneix *in vitro* amb baixa afinitat a la caixa GT del promotor del gen que codifica pel receptor de l'antigen T (Kingsley i Winoto, 1992). Sembla que aquest factor podria actuar en funció del tipus cel·lular. Recentment, s'ha detectat que l'expressió d'Sp2 està incrementada en cèl·lules tumorals (Phan i col·l, 2004). La unió d'Sp2 i la transactivació produïdes són regulades negativament en cèl·lules de mamífers (Moorefield i col·l, 2004). Moorefield i col·l (2006) descriuen que Sp2 està localitzat en la matriu nuclear; aquesta localització jugaria un paper important en la regulació de la funció d'Sp2. És probable que Sp2 estigui implicat en la regulació de gens diferents que els regulats per Sp1, Sp3 i Sp4 (Moorefield i col·l, 2004, 2006).

1.3.1.C. Sp3

Sp3 és altament homòleg a Sp1; té la mateixa afinitat per les caixes GC i GT que Sp1, tot i que existeixen diferències funcionals. El seu paper en la regulació de la transcripció és complex, fet degut a l'existència de tres isoformes d'Sp3.

Embrions deficientes en Sp3 es desenvolupen fins un any, però posteriorment moren per fallada respiratòria (Bouwman i col·l, 2000).

1.3.1.C.1 Estructura

Existeixen tres isoformes d'Sp3: una proteïna de 697 aminoàcids, amb un pes molecular de 110-115 kDa, dependent de l'estat de fosforilació (Hagen i col·l, 1992; Kingsley i Winoto, 1992) i dues formes truncades d'aproximadament 60-70 kDa.

Estudis de Kingsley i Winoto, (1992) descriuen que la proteïna Sp3 de 697 aa deriva de la traducció iniciada a partir d'un codó AUU. Les dues formes truncades provenen de l'inici de traducció a partir de dos codons interns AUG molt propers entre si (Kennet i col·l, 1997). El domini d'unió a DNA i els dominis A i B estan molt conservats en el factor de transcripció Sp3. A continuació se situa el domini C, que conté una zona rica en serines i treonines, i la caixa Btd. En aquesta regió també s'han descrit seqüències PEST. A l'extrem C-terminal es localitza el domini D. A diferència d' Sp1, el domini inhibidor (DI) està situat immediatament davant dels dits de zinc. Aquesta diferència entre ambdós factors podria explicar el diferent comportament d'aquests a nivell transcripcional (Murata i col·l, 1994). (Estructura esquematitzada a la figura 6).

1.3.1.C.2 Anàlisi funcional

Sp3 pot actuar com a activador o bé com a repressor de la transcripció (Udvardi i col·l, 1995; Ihn i Trojanowska, 1997; Ding i col·l, 1999; Galvagni i col·l, 2001; Bouwman i Philipsen, 2002; Castoldi i col·l, 2002; Parakati i col·l, 2002). En alguns casos, en co-transfectar Sp3 amb Sp1 s'observen efectes additius (Ihn i Trojanowska, 1997; Ko i col·l, 1998) i sinèrgics (Bigger i col·l, 1997; Netzker i col·l, 1997). En altres circumstàncies Sp3 pot reprimir l'activació produïda per Sp1 o altres factors de transcripció (Birnbbaum i col·l, 1995; Denning i col·l, 1996; Majello i col·l, 1997; Yu i col·l, 1999; Pan i col·l, 2000). En els casos en què Sp3 inhibeix la transactivació mitjançada per altres membres Sp/KLF, es produeix una competició pel mateix lloc d'unió. En concordança amb aquest argument, s'ha demostrat que els mutants Sp3 no són capaços de suprimir la transactivació mitjançada per Sp1 o Sp4 (Hagen i col·l, 1994, 1995).

S'ha descrit que alguns promotors poden ser activats per Sp3 en cèl·lules de *Drosophila* però no en certes cèl·lules de mamífers (Hansen i col·l, 1999) i viceversa (Sjottem i col·l, 1996), la qual cosa demostra la complexa naturalesa d'aquest factor de transcripció. La seva activitat en la regulació transcripcional podria dependre del context cel·lular.

La funció repressora de la transcripció per Sp3 depèn del nombre de llocs d'unió a Sp en el promotor. S'ha proposat que Sp3 actuaria com a transactivador en promotors que només continguin un sol lloc d'unió, i com a repressor en promotors amb més d'un lloc d'unió Sp (Birnbbaum i col·l, 1995; Dennig i col·l, 1995; Majello i col·l, 1995).

Les bases moleculars del paper repressor d'Sp3 sota certes condicions podria ser deguda al domini inhibidor. Sembla ser que funciona en *trans* mitjançant la interacció amb altres proteïnes. D'acord amb aquesta hipòtesi s'ha descrit el clonatge d'una proteïna anomenada SIF-1 (Sp3 *interacting factor*), que interacciona específicament amb el domini inhibidor d'Sp3 (Suske, i col 1999). La sobreexpressió del domini inhibidor lliure no té efecte en la transcripció dependent d'Sp3 (Denning i col·l, 1996), la qual cosa està en concordança amb els experiments que mostren que Sp3 només pot reprimir la transcripció quan està unit al promotor (De Luca i col·l, 1996; Denning i col·l, 1996). Bouwman i Philipsen (2002) suggereixen que la interacció amb una proteïna com SIF-1 podria afectar d'alguna manera a la maquinària basal de transcripció.

El domini C conté un conjunt d'aminoàcids carregats que no estan presents en el mateix domini d'Sp1 (Dennig i col·l, 1996). El triplet d'aminoàcids KKE, presents en el domini inhibidor, són essencials per a la funció repressora. La mutació d'aquests aminoàcids converteix Sp3 d'inactiu a un fort activador, especialment en els promotors que continguin múltiples llocs d'unió (Dennig i col·l, 1996). Els residus de lisina d'aquest triplet d'aminoàcids són acetilats *in vivo*. La mutació d'aquests residus impedeix l'acetilació de la proteïna. Aquests resultats suggereixen que l'activitat transcripcional d'Sp3 és regulada per acetilació (Braun i col·l, 2001). L'estat d'acetilació podria determinar la funció activadora o repressora d'Sp3 (Ammanamanchi i col·l, 2003). Sp3 també pot ser regulat per fosforilació (Ge i col·l, 2002; Bakovic i col·l, 2003) i sumoilació (Ross i col·l, 2002; Sapetschnig i col·l,

2002; Spengler i col·l, 2005), aquestes modificacions poden influir en el paper que presenta Sp3 en la regulació de la transcripció.

Recentment, ha estat clonat i caracteritzat el promotor d'Sp3 (Lou i col·l, 2005; Tapias i col·l, 2005), i s'ha demostrat que conté llocs d'unió Sp1/Sp3 que estan implicats en la regulació de l'activitat promotora d'Sp3. L'estudi de la regió promotora d'Sp3 revela un paper important d'Sp1, Sp3 i NF-Y en la regulació del promotor (Tapias i col·l, 2005).

1.3.1.D. Sp4

Sp4 mostra un patró d'expressió més restrictiu, es troba predominantment en cervell (Hagen i col·l, 1992; Supp i col·l, 1996; Scohy i col·l, 2000; Leonid i col·l, 2005). S'ha descrit que Sp4 actua com a regulador de gens específics de retina (Leonid i col·l, 2005).

Sp4 mostra un potencial de transactivació similar a l'acció activadora d'Sp1 a través dels dominis activadors rics en glutamina. Però, mentre que Sp1 pot activar sinèrgicament promotors que continguin molts llocs d'unió, la transactivació amb Sp4 només es produeix de forma additiva (Hagen i col·l, 1995), no és capaç d'actuar sinèrgicament a través de llocs d'unió adjacents. Sp4 pot actuar com a diana d'activació d'Sp1, suggerint que els dominis d'activació d'Sp1 i Sp4 estan relacionats funcionalment (Hagen i col·l, 1995). L'efecte transactivador d'Sp4 sobre diferents promotors i tipus cel·lulars no ha estat estudiat tan intensament com en el cas d'Sp1 i Sp3.

1.3.1.E. Regulació a través de la relació Sp1/Sp3

Sp1 i Sp3 poden competir pel mateix lloc d'unió *in vivo*. La caracterització d'Sp1 i Sp3 mostra que difereixen en la seva capacitat d'activar o reprimir la transcripció. (Suske G., 1999; Bouwman i Philipsen, 2002). Independentment de si Sp3 actua com a activador o repressor de l'activació produïda per Sp1, l'abundància relativa d'Sp1 i Sp3, té un paper important en la regulació de l'activitat gènica. L'abundància d'Sp1 i Sp3 varia entre els diferents tipus cel·lulars, i els diferents estats del cicle cel·lular (Apt i col·l, 1996; Discher i col·l, 1998). Els canvis en l'expressió d'Sp1 i Sp3 poden tenir grans conseqüències en l'activació transcripcional de diferents gens, tenint en compte la doble naturalesa d'Sp3, que pot actuar com a activador i inhibidor. En molts casos l'increment de la relació Sp1/Sp3 pot estar correlacionat amb l'increment d'expressió de gens. En aquest context cel·lular, aquests gens poden ser activats per Sp1 i reprimits per Sp3, suggerint que la transcripció del gen és regulada a través de la cooperació entre els dos factors de transcripció (Hata i col·l, 1998; Suske G., 1999; Bouwman i Philipsen, 2002; Leo i col·l, 2004; Pang i col·l, 2004).

La hipòxia produeix una disminució dels nivells d'Sp3, mentre que els nivells d'Sp1 es mantenen invariables. En conseqüència, s'elimina la repressió transcripcional associada a Sp3, i es produeix l'activació del promotor dels enzims glicolítics PK-M, específica de múscul, i la β -enolasa (Discher i col·l, 1998). Com altres enzims glicolítics, aquests gens estan

sobrerregulats sota baixa pressió d'oxigen. Els elements de resposta a hipòxia en aquests dos gens han estat localitzats en els elements GC d'unió a Sp1 i Sp3.

Quan la relació Sp1/Sp3 és elevada els nivells d'expressió gènica d'hSR (receptor humà de secretina) incrementen, mentre que quan els nivells d'Sp3 són més elevats l'expressió d'hSR s'inhibeix (Pang i col·l, 2004).

Yu i col·l (2003) han comparat les propietats d'unió a DNA d'Sp1 i Sp3. Sp3 s'uneix de manera diferent a promotors que contenen un sol lloc d'unió que a promotors que contenen més d'un lloc d'unió adjacents. En els promotors amb múltiples llocs d'unió adjacents, els complexos Sp3-DNA que es formen són més estables que els que contenen un sol lloc d'unió i que els complexos Sp1-DNA. D'aquesta manera, l'eficàcia d'unió d'Sp3 desplaçaria Sp1 de la unió amb el DNA.

1.4. FAMÍLIA SREBP

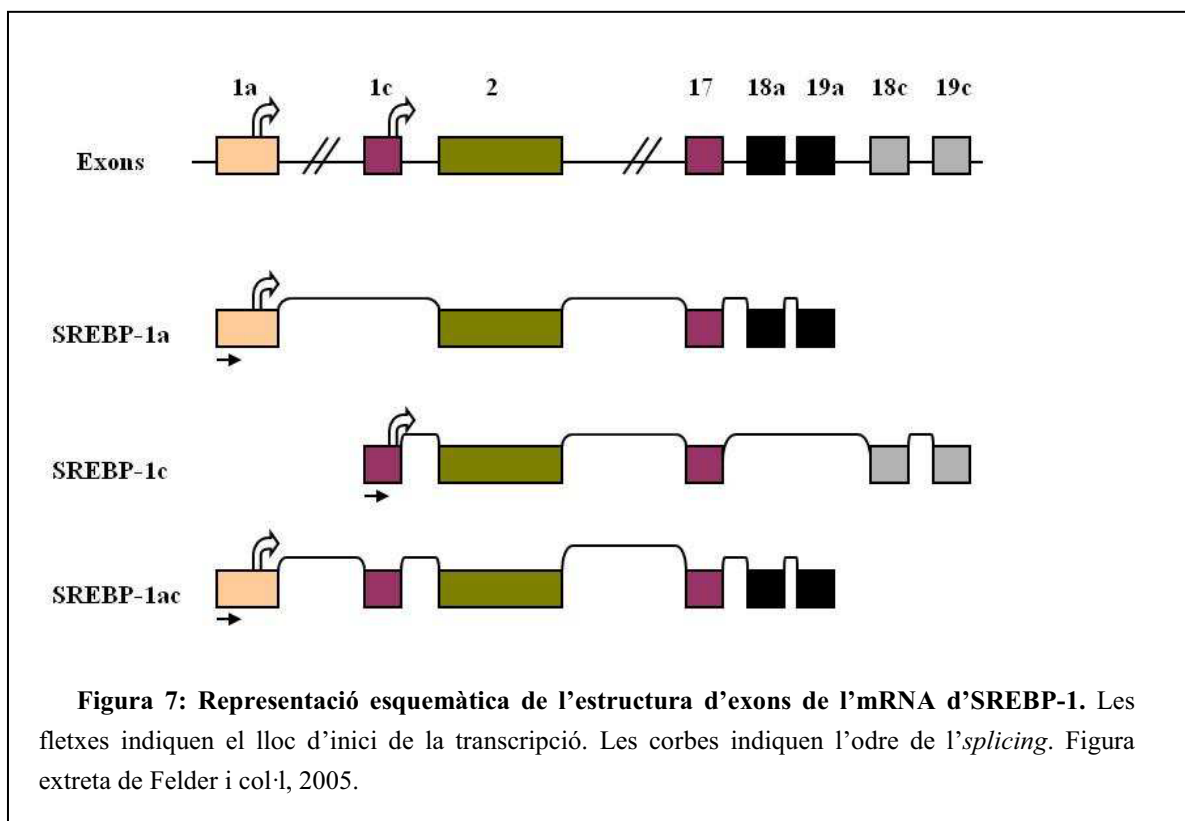
Les proteïnes SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins*) són factors de transcripció que pertanyen a la família *helix-loop-helix* cremallera de leucines (bHLH-LZ) (Brown i col·l, 1997, 1999; Horton J.D., 2002). S'han detectat dos gens, SREBP-1 i SREBP-2, en diferents espècies de mamífers (ratolí, rata hámster, i humà), que codifiquen per a isoformes dels SREBPs.

1.4.1. ESTRUCTURA

Els factors de transcripció SREBP tenen en comú una estructura formada per tres dominis: un fragment N-terminal format per 480 aminoàcids, que constitueix el domini bàsic *helix-loop-helix* cremallera de leucines (bHLH-LZ) (Hua i col·l, 1995); un domini central de 80 aminoàcids que conté dues seqüències transmembrana separades per 31 aminoàcids situades en la llum del reticle endoplasmàtic (Shimomura i col·l, 1997); i un domini C-terminal format per uns 590 aminoàcids implicat en la regulació per esterols (Sato i col·l, 1994). La zona implicada en l'activació transcripcional dels SREBPs està formada per una regió d'aminoàcids àcids que comprenen el domini transactivador, un domini ric en residus de prolina, i un domini bHLH-LZ que permet la dimerització, import nuclear i unió al DNA. Els SREBPs presenten un residu de tirosina que els permet unir-se a caixes E (5'-CANNTG-3'), a proteïnes bHLH, i a seqüències SRE (*Sterol Regulatory Element*) (5'-TCACNCNCCAC-3') (Kim i col·l, 1995). La importància del residu de tirosina per a la unió a SRE va ser demostrada per Kim i col·l (1995).

1.4.2. ISOFORMES CODIFICADES PER *SREBP-1*

SREBP-1a i SREBP-1c (també anomenat ADD1, per la seva implicació en la determinació i diferenciació adipocitària; Tontonoz i col·l, 1993), són codificats per un únic gen a través de la utilització de llocs alternatius d'iniciació de la transcripció, i difereixen en el primer exó (Hua i col·l, 1995) (figura 7).



En ratolins, el primer exó d'SREBP-1a codifica per 29 aminoàcids, 8 dels quals són de naturalesa àcida, mentre que el primer exó d'SREBP-1c codifica per cinc aminoàcids, dels quals només un és àcid. El domini activador de les proteïnes SREBP-1 està localitzat en la regió N-terminal (Satto i col·l, 1994; Toth i col·l, 2004). Experiments *in vitro* i *in vivo* mostren que SREBP-1a és molt més potent que SREBP-1c (Shimano i col·l, 1997). SREBP-1a conté un potent domini activador, responsable de la interacció amb coactivadors transcripcionals com CREB/p300 (CREB: *cAMP-response-element-binding protein*) (Oliner i col·l, 1996; Ericsson i col·l, 1998). Les interaccions d'SREBP-1c podrien ser menys eficients a causa de la petita longitud del domini àcid.

L'eficiència en l'escissió del precursor en resposta a una disminució dels nivells de colesterol difereix entre SREBP-1a i 1c en els exons 18 i 19 de la regió C-terminal (Hua i col·l, 1996). Recentment, s'ha descrit l'existència d'una nova isoforma en humans: SREBP-1ac, la qual conté un domini d'activació amb 30 aminoàcids addicionals en relació amb SREBP-1a (Figura 7). Estudis preliminars indiquen que SREBP-1ac podria actuar com a

repressor d'altres isoformes d'SREBPs (Felder i col·l, 2005). L'heterodímer SREBP-1a c s'expressa a nivells inferiors que SREBP-1a i SREBP-1c.

Els SREBP-1a i 1c també difereixen en la seva distribució tissular. SREBP-1c s'expressa en fetge, teixit adipós blanc, glàndules adrenals, en cervell i múscul de rates adultes i humans (Shimomura i col·l, 1997; Ducluzeau i col·l, 2001; Guillet-Deniau i col·l, 2002). En contrast, SREBP-1a s'expressa àmpliament a nivells baixos en diferents teixits, majoritàriament en teixits amb elevada capacitat per la proliferació cel·lular, com la melsa i l'intestí (Shimomura i col·l, 1997).

La relació entre l'mRNA d'SREBP-1a i SREBP-1c varia des de 10:1 en melsa fins 1:10 en fetge de rata (Shimomura i col·l, 1997). Aquesta diferència és deguda a què els nivells d'mRNA d'SREBP-1c varien entre els diferents teixits, mentre que l'mRNA d'SREBP-1a es manté de forma estable a nivells baixos.

1.4.3. ISOFORMES CODIFICADES PER SREBP-2

El tercer membre de la família, SREBP-2, està codificat per un gen diferent, i mostra una homologia del 50 % amb la seqüència aminoacídica dels SREBP-1.

Recentment, s'ha identificat una isoforma anomenada SREBP-2gc. Aquesta isoforma activa els promotors de gens relacionats amb l'espermatogènesi (Wang i col·l, 2002, 2004).

1.4.4. PROCÉS DE MADURACIÓ DELS SREBP

Els SREBPs són sintetitzats en forma d'un precursor que es manté unit al reticle endoplasmàtic (ER) i a membranes nuclears, en presència de concentració elevada d'esterols. Dos processos proteolítics alliberen el domini aminoterminal, què constitueix el factor de transcripció madur (Horton i col·l, 2002).

En el primer tall proteolític participa la proteasa site-1 (S1P), la qual hidrolitza el loop luminal d'SREBPs separant-lo en dues parts (DeBose-Boyd i col·l, 1999; Espenshade i col·l, 1999). El segon trencament dels SREBPs és dependent del primer, i té lloc només quan S1P ha tallat SREBP. En la maduració dels SREBP, també hi intervé la proteasa S2P (site-2-proteasa) que proteolitza SREBP en els segments transmembrana (Rawson i col·l, 1997).

Existeixen dues proteïnes més que són essencials per a la maduració dels SREBPs: la proteïna SCAP (*SREBP Cleavage Activating Protein*) i la proteïna codificada per *Insig (Insulin-Induced Gene)*.

L'obtenció de ratolins deficientes en SCAP va permetre determinar el paper que presenta SCAP com a sensor d'esterols (Matsuda i col·l, 2001). Aquests ratolins presentaven una gran disminució en els nivells nuclears d'SREBP-1 i SREBP-2, la qual cosa comporta un decrement dramàtic dels nivells basals d'mRNA que codifica per a enzims implicats en la biosíntesi de colesterol i àcids grassos.

Insig és una proteïna que està localitzada a les membranes del reticle endoplasmàtic, i que pot interaccionar amb SCAP. Insig actua retenint el complex SCAP-SREBP en el reticle

endoplasmàtic (Yabe i col·l, 2002a,b; Yang i col·l, 2002; Adams i col·l, 2003; Engelking i col·l, 2004; Takaishi i col·l, 2004).

S'ha suggerit que la insulina indueix la maduració d'SREBP-1c a través de la disminució dels nivells d'Insig (Yabe i col·l, 2003). Recentment, s'ha descrit que la insulina podria estar implicada en la interrupció de la unió entre SCAP i Insig a través d'un canvi conformacional o una ràpida degradació de les proteïnes implicades en la via de processament d'SREBP. Aquesta acció podria estar reforçada amb la disminució de l'expressió d'Insig en resposta a una exposició perllongada a insulina (Hegarty i col·l, 2005).

1.4.5. ANÀLISI FUNCIONAL

Originàriament es va descriure la família de factors de transcripció SREBP com a reguladors de gens implicats en la disponibilitat cel·lular del colesterol (Wang i col·l, 1994). Estudis posteriors han relacionat SREBP-1a amb l'activació de l'expressió de gens implicats tant en el metabolisme del colesterol com en la síntesi lipídica (Eberle i col·l, 2004), mentre que SREBP-1c és més específic en l'estimulació de la biosíntesi d'àcids grassos. SREBP-2 està majoritàriament implicat en la regulació de l'homeòstasi del colesterol (Brown i Goldstein, 1999; Horton i col·l, 2002). Recentment, s'ha relacionat SREBP-1 amb la regulació del metabolisme glucídic (Yamamoto i col·l, 2004; Gosmain i col·l, 2005).

Tot i que SREBP-1a i 1c comparteixen gens diana, entre ambdues existeixen diferències en l'afinitat d'unió a DNA i posterior efecte transactivador (Amemiya-Kudo i col·l, 2002). SREBP-1a i -2 són altament regulats per concentracions intracel·lulars d'esterols en cultius cel·lulars (Brown i col·l, 1997). El promotor d'SREBP-2 està regulat per hormones tiroïdals (Shin i col·l, 2003) i és autorregulat per SREBPs (Sato i col·l, 1996).

Un increment en la demanda de colesterol indueix en fetge de hàmtar un increment en l'expressió d'SREBP-2, mentre que l'expressió i l'abundància nuclear de la forma SREBP-1 està disminuïda (Sheng i col·l, 1995).

SREBP-1a i SREBP-1c es regulen de la mateixa manera i independentment en resposta a situacions de dejú i posterior realimentació. Els nivells d'SREBP-1a i 1c (tant la forma precursora com la nuclear) disminueixen en animals dejunats i es troben incrementats en ser realimentats (Liang i col·l, 2002; Zhang i col·l, 2005).

Els nivells hepàtics d'mRNA que codifiquen per a SREBP-1c disminueixen en cas de diabetis experimental i retornen als nivells normals després del tractament amb insulina (Shimomura i col·l, 1999).

Estudis en mamífers mostren que la regulació d'SREBP-1c per insulina és clau per a la resposta lipogènica del fetge a situacions de dejú- realimentació amb dietes d'elevat contingut en carbohidrats (Liang i col·l, 2002). Pel contrari, Matsuzaka i col·l (2004) han descrit, recentment, que l'increment d'SREBP-1c en ratolins en situació de realimentació pot produir-se independentment de l'acció de la insulina.

L'acció de la insulina sobre l'expressió d'SREBP-1c pot basar-se en tres punts. Per una banda, s'ha observat que l'expressió d'SREBP-1c es veu transcripcionalment activada per insulina i reprimida per glucagó (Foretz i col·l, 1999b; Azzout-Marniche i col·l, 2000); d'altra

banda, existeixen evidències que indiquen que l'abundància nuclear d'SREBP-1c es veu afavorida per la presència d'insulina (Shimano i col·l, 1997; Azzout-Marniche i col·l, 2000). Finalment, SREBP-1c podria ser diana de la MAPK, conegut mediador de l'acció de la insulina (Kotzka i col·l, 1998). Així mateix, s'ha descrit que SREBP-1c podria ser una diana de senyalització d'Akt per a la inducció del gen hepàtic *GCK* (Ribaux i col·l, 2003).

SREBP-1c podria mediar l'efecte de la insulina en la inducció de l'expressió del gen que codifica per a la *GCK* hepàtica (Foretz i col·l, 1999a,b; Shimomura i col·l, 1999). SREBP-1c interacciona *in vivo* amb el promotor de l'hexoquinasa II, i media l'acció de la insulina en la regulació de la transcripció d'*HCK II* i *GCK* en fetge (Shimomura i col·l, 1999; Foretz i col·l, 1999; Gosmain i col·l, 2004; Kim i col·l, 2004a).

Experiments realitzats amb cultius d'hepatòcits primaris evidencien la implicació d'SREBP-1c en la via de senyalització de la insulina (Foretz i col·l, 1999). El glucagó exerceix els efectes oposats a la insulina en l'expressió d'SREBP-1c, a través d'AMPc (Foretz i col·l, 1999). En hepatòcits aïllats o animals tractats amb estreptozotocina, la sobreexpressió d'SREBP-1c substitueix els requeriments d'insulina per a l'expressió de la *GCK* (Foretz i col·l, 1999a,b; Becard i col·l, 2001).

S'han identificat dos elements de resposta, SREa i SREb en el promotor de la *GCK* de fetge de rata i s'ha demostrat que SREBP-1c interacciona amb aquestes regions activant el promotor. Una dieta rica en carbohidrats incrementa la unió d'SREBP-1c a la zona -221/-169 del promotor de la *GCK* de fetge de rata que conté els elements SREa i SREb. Estudis posteriors revelen que la unió d'SREBP-1c a la zona -221/-169 del promotor de la *GCK* hepàtica de rata s'incrementa també per acció de l'insulina. Es suggereix que la unió d'SREBP-1c als elements de resposta SREa i SREb és la responsable de l'expressió de *GCK* hepàtica de rata en resposta a insulina (Kim i col·l, 2004a).

Existeixen altres autors que neguen la implicació d'SREBP-1c en l'activació de *GCK* per insulina (Stoekman i col·l, 2002; Ribaux i col·l, 2002; Gregori i col·l, 2006; Hansmann i col·l, 2006). Experiments amb cultius d'hepatòcits de rata deficientes en SREBP-1c, mostren que la inducció de l'expressió del gen *GCK* en resposta a insulina pot produir-se en absència de la forma madura nuclear d'SREBP-1c (Gregori i col·l, 2006).

S'ha descrit que la glucosa no indueix l'expressió d'SREBP-1 (Foretz i col·l, 1999b; Deng i col·l, 2002; Scott i col·l, 2003). Pel contrari, Hasty i col·l (2000) demostren que la glucosa incrementa l'expressió tant de la forma precursora com de la forma nuclear d'SREBP-1. Diètes amb elevat contingut en carbohidrats estimulen la formació de la forma madura d'SREBP-1 (Yahagi i col·l, 1999).

L'activació del promotor d'SREBP-1c per insulina, en hepatòcits de rata, implica l'acció combinada de diferents factors de transcripció: LXRa, SREBP, Sp1 i NF-Y (Amemiya-Kudo i col·l, 2002; Cagen i col·l, 2005). S'ha descrit que LXR indueix l'expressió d'SREBP1c via un element de resposta a LXR localitzat en el promotor d'SREBP1c (Repa i col·l, 2000; Yoshikawa i col·l, 2001). LXR podria mediar alguns dels efectes de la insulina sobre SREBP-1c. (Chen i col·l, 2004; Steffensen i col·l, 2004).

Zhang i col·l, descriuen que l'expressió d'SREBP-1a està regulada per un promotor que conté dos lloc d'unió a Sp1 que són claus per a l'activitat promotora. Aquest fet suggereix que Sp1 podria modular SREBP-1a en resposta a insulina (Zhang i col·l, 2005).

El promotor d'SREBP-1c està regulat per glucosa, activadors de LXR_s (receptor hepàtic X), i és autoregulat per SREBP_s (Amemiya-Kudo i col·l, 2000; Hasty i col·l, 2000; Repa i col·l, 2000; Hegarty i col·l, 2005). SREBP-1c podria actuar com a repressor d'altres formes SREBP_s a través de la formació d'heterodímers (Datta i col·l, 2005).

1.5. 6-FOSFOFRUCTO-2-QUINASA/FRUCTOSA-2,6-BIFOSFATASA

1.5.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS

La PFKFB és un enzim bifuncional que catalitza la síntesi i degradació de fru-2,6P₂, el qual actua com a regulador de la glucòlisi/gluconeogènesi a través de l'activació al·lostèrica de l'enzim glucolític PFK i inhibició simultània de l'enzim gluconeogènic FBP1 (Hers i col·l, 1982; Hue i Rider, 1987; Pilkis i col·l, 1995; Okar i col·l, 1999, 2001, 2004). Així, l'enzim PFKFB al modular la síntesi i degradació de fru-2,6P₂, regula la direcció del flux del cicle substrat que implica la interconversió entre fru-6P /fru-1,6P₂ (Hue i Rider, 1987; Pilkis i col·l, 1988), i conseqüentment la glucòlisi/gluconeogènesi.

En mamífers, la PFKFB s'expressa en diversos teixits: fetge (PFKFB1) (Darville i col·l, 1987; Algaier i col·l, 1988; Lively i col·l, 1988; Lange i col·l, 1991), múscul esquelètic (Darville i col·l, 1989; García de Frutos, 1994), cor (Kitamura i col·l, 1988; Sakata i col·l, 1990; Darville i col·l, 1991; Tsuchiya i col·l, 1994; Heine-Suñer i col·l, 1998), testicle (Sakata i col·l, 1991; Manzano i col·l, 1999), cervell (Ventura i col·l, 1991; Watanabe i col·l, 1994), teixit adipós (Bruni i col·l, 1999) i pàncrees (Batra i col·l, 1996; Sakurai i col·l, 1996).

La PFKFB s'ha estudiat també en altres vertebrats com aus, amfibis i peixos. Ha estat clonat el cDNA corresponents a la forma de fetge de pollastre (Li i col·l, 1993), així com a les isoformes hepàtica i muscular de granota (Pyko i col·l, 1993; Sakai i col·l, 1994). L'enzim bifuncional ha estat estudiat també en l'invertebrat marí *Mytilus galloprovincialis* (Vázquez-Illanes i col·l, 1991; 1992). Així mateix, s'ha clonat el cDNA de *PFKFB1* d'orada (Metón i col·l, 1999a). El comportament cinètic de l'enzim purificat de fetge d'orada presenta certes diferències en relació amb la corresponent isoforma hepàtica de rata (García de Frutos i col·l, 1994, 1995). La PFKFB1 de fetge de *Sparus aurata* presenta una afinitat pel substrat (fru-6P) tres vegades inferior a la de les corresponents isoformes de mamífers. Per altra banda, la PFKFB1 d'orada s'inhibeix en presència d'ADP, citrat i fosfoenolpiruvat, però, a diferència de l'enzim de rata, la forma no fosforilada de l'enzim d'orada mostra una escassa inhibició per glicerol-3P (García de Frutos i col·l, 1994).

Les diferències entre les diverses isoformes de la PFKFB se centren principalment en els extrems amino i carboxil terminals de l'enzim; aquestes regions determinen la resposta a efectors al·lostèrics i a senyals hormonals, i permeten regular les dues activitats de l'enzim bifuncional d'acord amb les necessitats específiques de cada teixit (Kurland i col·l, 1995). La

seqüència responsable de l'activitat quinasa se situa a l'extrem N-terminal, mentre que els aminoàcids crítics per a l'activitat bifosfatasa estan localitzats en el domini C-terminal de la proteïna (El-Magrabi i col·l, 1990; Pilkis i Claus, 1991; Pilkis i col·l, 1995).

L'elevada homologia entre les seqüències aminoacídiques que codifiquen per a les PFKFB d'orada i mamífers, i els models moleculars descrits per a les isoformes de peix i rata indiquen un alt grau de semblança estructural i de conservació durant l'evolució (Metón i col·l, 2003).

L'organització gènica de *PFKFB* en mamífers és complexa, addicionalment a la presència de diferents isoenzims en un mateix teixit, poden generar-se múltiples transcrits mitjançant processament alternatiu (Vidal i col·l, 1993). Aquesta complexitat també es presenta en peixos (Metón i col·l, 1999a; Panserat i col·l, 2001).

1.5.2. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE LA PFKB1

En mamífers, la PFKFB1 està regulada per factors nutricionals, hormonals i genètics (Hue i Rider, 1987; Rosa i col·l, 1993; Lemaigre i Rousseau, 1994; Pilkis i col·l, 1995).

En rata, situacions de dejuni i diabetis condueixen a un descens de l'activitat enzimàtica de la PFKFB1, acompanyada per una disminució en la quantitat de proteïna total, sense que l'abundància del missatger hepàtic de l'enzim es modifiqui de manera significativa (Colosia i col·l, 1988; Crépin i col·l, 1988). Altres autors detecten descensos en els nivells de missatger de *PFKFB1* en rates diabètiques i/o obeses (Pérez i col·l, 1998). Els valors de proteïna i activitat de la PFKFB1 en rata es restableixen com a conseqüència de realimentació, després del dejú, amb dietes riques en carbohidrats o per administració d'insulina a animals diabètics; en aquests casos, s'aprecia addicionalment un increment en la quantitat d'mRNA (Colosia i col·l, 1988).

El dejú promou un descens en els nivells de proteïna PFKFB1 en orada acompanyat d'una reducció de 10 vegades en la relació entre forma activa/forma total de l'activitat quinasa de l'enzim. S'observa, addicionalment, una disminució de més del 50% en l'abundància del missatger, que resulta totalment contrarestada per realimentació (Metón i col·l, 1999a). A diferència del que s'ha observat a fetge de rata (Colosia i col·l, 1988; Crépin i col·l, 1988), el descens d'activitat quinasa promogut pel dejuni va acompanyat, a fetge d'orada, d'un descens en l'expressió de l'enzim, tant a nivell d'mRNA com a nivell de proteïna. La regulació a curt termini podria ser deguda a defosforilació i modulació al·lostèrica de l'enzim (García de Frutos i Baanante, 1994).

D'altra banda, l'expressió gènica de *PFKFB1* a fetge d'*S. aurata* incrementa tant en augmentar la quantitat de dieta com en incrementar la quantitat de carbohidrats de la dieta subministrada. En aquestes condicions, incrementen tant els nivells d'mRNA i de proteïna PFKFB1, com la concentració de fru-2,6P₂ (Metón i col·l, 2000a). S'ha suggerit que la regulació de *PFKFB1* a nivell d'mRNA per la quantitat de dieta pot estar relacionada amb els nivells d'hormones, particularment per la relació insulina/glucagó (Metón i col·l, 2000a). En fetge d'orada, dietes d'elevat contingut en carbohidrats i baix en proteïnes, o d'elevat contingut en carbohidrats i baix contingut lípids promouen un increment en l'expressió de

PFKFB1, de l'activitat quinasa de PFKFB1 i del metabòlit fru-2,6P₂. Així mateix, dietes d'elevat contingut en carbohidrats produeixen un increment en els nivells de fru-2,6P₂, i l'activitat quinasa de PFKFB1 en rates, mentre que dietes riques en proteïnes causen una disminució dels nivells del metabòlit i de l'activitat enzimàtica (Ku wajima i col·l, 1986; Bois-Joyeux i col·l, 1987; Carmona i col·l, 1991). Pel contrari, s'ha descrit que el canvi de dietes d'alt contingut en carbohidrats i baix en greixos a baix contingut en carbohidrats i alt en greixos no sembla afectar a llarg termini als nivells de fru-2,6P₂ en rates (Brooks i col·l, 1997).

Els glucocorticoides estimulen la transcripció gènica de *PFKFB1* en rata, mentre que el glucagó exerceix l'efecte oposat. Els efectes de la insulina depenen del context hormonal. El tractament amb insulina promou l'increment de la transcripció, mentre que inhibeix i reverteix l'estimulació transcripcional de *PFKFB1* produïda per glucocorticoides (Espinet i col·l, 1993; Lemaigre i Rousseau, 1994; Pilkis i col·l, 1995; Joaquin i col·l, 1997; Mc Farlan i col·l, 1997). L'activitat basal del promotor del gen *PFKFB1* està controlada per una unitat de resposta a glucocorticoides, que està regulada per la unió dels factors de transcripció ubiquus NF-1 i Oct-1 i els factors específics hepàtics HNF-3, HNF-6 i C/EBP (Lemaigre i col·l, 1991, 1993). S'ha descrit l'existència, en el promotor de *PFKFB1*, d'una regió de resposta a glucosa, (Dupriez i Rosseau, 1997); els factors de transcripció implicats en l'efecte de la glucosa no han estat identificats.

2. MATERIALS I MÈTODES

2.1 **MATERIALS:**

2.1.1 ANIMALS UTILITZATS EN L'EXPERIMENTACIÓ

Per a la realització d'aquest treball s'han utilitzat mostres biològiques procedents d'orada (*Sparus aurata*, L.). L'orada és un peix teleosti que pertany a la família *Sparidae*, de l'ordre dels Perciformes. Té el cos de forma oval i comprimit, i es caracteritza per la presència d'una franja daurada, situada entre els ulls i una taca fosca sobre l'opercle. Pot arribar a pesar més de 5 Kg, i a mesurar 70 cm de llargada.

L'orada és pròpia de les aigües càlides del Mediterrani. S'extén també pel Mar Negre, el Mar Roig i les costes orientals de l'Atlàntic, des de les illes britàniques fins al Senegal.

És una espècie litoral, euriterma (5-35 °C de temperatura) i eurihalina (capaç de créixer en diferents condicions de salinitat) constituïda per individus generalment solitaris o que formen grups reduïts, malgrat que quan són joves poden reunir-se en grups més nombrosos. Es troben a una fondària que oscil·la entre els 30 i 150 m. La seva dieta natural és preferentment carnívora, d'hàbits predadors, amb una dieta que consisteix bàsicament en la ingesta de proteïnes procedents de mol·luscs, crustacis i peixos petits.

Les orades constitueixen una espècie hermafrodita proteràndrica, que no es diferencia sexualment fins al primer any de vida; posteriorment, es comporten com a mascles durant 2-3 anys i es diferencien finalment de manera definitiva a femelles.

L'aqüicultura ha experimentat un gran increment, passant de menys d'un milió de tones a inicis dels anys 50, a 59,4 milions de tones al 2004. Ha proporcionat al llarg d'aquest any, aproximadament, el 50% del peix pel consum humà en àmbit mundial (*State of world aquaculture*, 2006). L'orada presenta un creixent interès comercial degut a la millora del seu cultiu. És molt apreciada en les regions europees del Mediterrani, fet pel qual la pesca i el cultiu d'aquesta espècie té molta importància econòmica en aquesta zona.

2.1.1.A **Manipulació dels peixos i presa de mostres**

En el procés de manipulació d'animals s'han seguit unes pautes concretes per evitar que la manipulació incideixi en el resultat dels experiments realitzats.

Les orades utilitzades en l'experimentació descrita en aquesta memòria procedien del centre de Tina Menor SA, a Santander; foren transportades per via aèria al laboratori en aigua de mar insuflada amb oxigen. En el laboratori, aquestes orades es mantingueren en aigua de mar airejada i filtrada en circuit tancat, a 20 °C, en aquaris de 200 litres de capacitat equipats amb llums d'ultraviolats, i se sotmeteren a cicles de llum/fosc de 12 hores/12 hores. Les orades tenien un pes inicial d'aproximadament 2 g, i es van alimentar amb dietes corresponents al 5 % del pes corporal dues vegades al dia. En assolir els 20 g, aproximadament, les orades passaren a ser alimentades una vegada al dia amb quantitats de dieta corresponents al 2% del pes mitjà dels peixos de cada aquari. Els peixos es pesaven cada setmana per tal d'ajustar periòdicament la quantitat i tipus de dieta adequada a l'experiment a realitzar.

Totes les manipulacions realitzades s'han dut a terme segons les normes del Comitè Ètic d'Experimentació amb Animals de la Universitat de Barcelona.

El protocol seguit en el moment de prendre les mostres pretén que es provoqui el mínim estrès o situacions d'anòxia en els peixos.

PROTOCOL DE PRESA DE MOSTRES:

A) Preliminars

1. Preparar un aquari de capacitat adequada a la mida i número de peixos a sacrificar amb aigua, proveït d'airejador. Dissoldre-hi l'agent anestesiant MS-222 (metanosulfonat de tricaina) en una proporció de 70 mg/l (p/v).
2. Retirar les orades dels aquaris d'experimentació i introduir-les immediatament, per grups de 3-4 individus com a màxim, en l'aquari amb anestèsic.
3. Esperar fins que els peixos quedin sedats (5-10 minuts).
4. Pesar cada orada. Procedir al sacrifici i presa de mostres.

B) Presa de mostres

1. Sacrificar l'orada amb un tall cervical.
2. Obtenir-ne la sang amb una pipeta *Pasteur* de vidre prèviament tractada amb solució de citrat sòdic al 3%.
3. Obrir el peix ventralment i extreure'n el fetge. Per eliminar les restes de sang o bilis, es renta el teixit submergint-lo en solució de NaCl al 0,9%. Es congela immediatament per la tècnica de *freeze clamping*, amb pinces prèviament refredades en nitrogen líquid. El fetge es manté a -80 °C fins que és utilitzat.
4. Per a l'extracció d'altres òrgans es du a terme el mateix procediment que l'efectuat en el cas del fetge.
5. La sang obtinguda es deixa a temperatura ambient 30 minuts aproximadament, després es centrifuga a 6000 g a 4 °C, durant 10 minuts. Es retira el sèrum i es manté congelat a -20 °C fins a ser utilitzat.

2.1.1.A.1 Efecte de l'estat nutricional

Les orades foren transportades al laboratori i es distribuïren en aquaris. Els peixos es van alimentar durant 18 dies amb una única ració diària de dieta. A continuació, se sotmeteren a un període de dejuni de 19 dies i finalment, es van realimentar durant 22 dies amb dieta MP (nivells intermedis de proteïna i de carbohidrats). Es van recollir el sèrum i mostres hepàtiques després dels 18 dies inicials d'alimentació, als 19 dies de dejuni i després de 9 hores, 1, 3, 8 i 22 dies de la realimentació.

La presa de mostres es va efectuar seguint el protocol descrit en l'apartat 2.1.1.A.

Composició de la dieta MP (%)	
Proteïna	47,7
Carbohidrats	13,1
Lípids	16,2
Minerals	20
Humitat	3
Energia (kJ/g)	20

Formulació de la dieta (g/kg dieta)	
Proteïna de peix	81,74
Oli de peix	6,58
Fècula de blat gelatinitza	9,18
Mescla de vitamines	0,47
Carragenats	2
Butirat d'hidoxitoluè	0,03

2.1.1.A.2 Efecte d'insulina i glucosa

Les orades es transportaren al laboratori i foren distribuïdes en 4 aquaris. Les orades varen ser alimentades a l'1% del pes corporal amb la dieta Dibaq.

Mitjançant una injecció intraperitoneal, als peixos se'ls va subministrar solució salina (peixos control), insulina (10 U/kg peix) o glucosa (2g/kg peix). Els peixos no tractats també es van prendre com a peixos control.

Sis hores després de la injecció intraperitoneal els peixos varen ser sacrificats. La presa de mostres es va realitzar seguint el protocol descrit en l'apartat 2.1.1.A.

Composició de la dieta DIBAQ (%)	
Proteïna	46
Carbohidrats	18,2
Lípids	22
Humitat	11,5
Cel·lulosa	1
Fòsfor Total	1,3

SOLUCIONS:

Glucosa:

Solució de 400 mg/ml en solució salina. Esterilitzar la solució per filtració.

Insulina: (bovina, Sigma, 27 U/mg)

Solució de 0.77 U/ μ l, en HCl 5 mM. La solució es dilueix amb solució salina fins obtenir una concentració de 2 U/100 μ l.

2.1.2 SOQUES D'*ESCHERICHIA COLI* UTILITZADES

E. coli XL1 Blue: *end A1, hsd R17 (rk-, mk+), sup E44, thi-1, λ , rec A1, gyr A96, thi-1, rel A1.*

E coli DH5 α : *sup E44, Δ lacU169 (90 lac ZDN15), hsd R17, rec A1, gyr A96, thi-1, rel A1.*

2.1.3 CULTIUS CEL·LULARS

2.1.3.A Línies cel·lulars utilitzades

Cèl·lules HepG2: (ATCC HB 8065) línia cel·lular derivada d'hepatoma humà. Les cèl·lules creixen i es mantenen amb medi DMEM (Gibco) a 37 °C en un incubador amb atmosfera humida al 5 % de CO₂.

Cèl·lules D11: (ATCC 77) línia cel·lular derivada de fetge de truita (*Oncorhynchus mykiss*). Aquestes cèl·lules van ser crescudes amb medi 199 (Gibco). La temperatura òptima de creixement és de 16-21 °C en absència de CO₂.

Cèl·lules CHO: (ATCC CCL-61) línia cel·lular derivada d'ovari de hámster xinès. Les cèl·lules es mantenen amb medi Ham'S F12 (Gibco) a 37 °C en un incubador amb atmosfera humida al 5 % de CO₂.

Tots els medis utilitzats pel creixement de les diferents línies cel·lulars van ser complementats amb una barreja d'antibiòtics (penicil·lina/estreptomicina), 2 mM de L-glutamina i un 10 % de sèrum fetal boví (FCS), llevat del cas de les cèl·lules D11, en què es va afegir un 20 % de FCS.

2.1.3.B Medis i reactius emprats

Medi DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium.* (Gibco).

FCS: *Foetal Calf Serum* (Gibco). Cal escalfar-lo a 50 °C durant 20 minuts abans de ser utilitzat, per tal d'inactivar les proteïnes del complement.

Medi Ham'S F12: F12 nutrient mixture (Ham), (Gibco).

Medi 199 (Gibco).

Penicil·lina/estreptomicina: solució de 10000 U/ml penicil·lina i 5000 μ g/ml estreptomicina (Gibco).

Glutamina: solució 200 mM (100 X). (Gibco).

Tripsina: tripsina-EDTA (1X), (Gibco).

PBS 10 X (pH 7,3)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM

2.1.4 PLASMIDIS

2.1.4.A Plasmidis d'expressió en eucariotes

pRC-CMV Sp1: plasmidi que conté el cDNA del factor de transcripció Sp1 de rata. Cedit pel Dr. Suske (*Institute of Molecular Biology and Tumor Research*, Alemanya; Hagen i col·l, 1994).

pRC-CMV Sp3: plasmidi que conté el cDNA del factor de transcripció Sp3 de rata. Cedit pel Dr. Suske (*Institute of Molecular Biology and Tumor Research*, Alemanya; Hagen i col·l, 1994).

pSG5-SREBP-1a: plasmidi que conté el cDNA del factor de transcripció SREBP-1a de rata. Cedit pel Dr. Haro (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (Farmàcia), Universitat de Barcelona, Espanya).

Ins RB: plasmidi que conté el cDNA del receptor B d'insulina humana. Cedit per Dr. J. Whitthaker (*Case Western Reserve University*, USA; Yoshimasa i col·l, 1988).

pcDNA₃: vector d'expressió eucariota *in vitro* i *in vivo*. S'ha utilitzat per expressar proteïnes *in vitro* a través del promotor T7 situat immediatament *upstream* dels llocs de clonatge de cDNA (Green i col·l, 1998).

2.1.4.B Vectors reporters

pGL3-Basic: vector mancat del promotor eucariòtic i seqüències *enhancer*. Permet l'estudi de regions promotores de gens que controlen l'expressió del gen reporter luciferasa (Promega).

pCMVβ: plasmidi utilitzat com a control d'eficiència en les transfeccions realitzades en cèl·lules en cultiu, aquest plasmidi expressa la β-galactosidasa en cèl·lules eucariotes.

2.1.4.C Altres

pACC-GKRP: plasmidi que codifica per a GKRP de rata. Cedit pel Dr. J.C. Ferrer (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (Biologia), Universitat de Barcelona, Espanya).

pEGFP-C₃: vector d'expressió de proteïnes fusionades en el seu extrem C-terminal amb la GFP (Clontech).

pEGFP-C₁-GKr: constructe que conté la *GCK* de rata a l'extrem C-terminal de la GFP amb un espaiador de 5 aminoàcids, sota el control del promotor constitutiu del citomegalovirus humà. Codifica per a la proteïna de fusió GFP-GCK de rata. Constructe cedit pel Dr. J.C. Ferrer (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (Biologia), Universitat de Barcelona, Espanya).

pGEM-Teasy: vector de tipus T que facilita la lligació de fragments de DNA obtinguts per amplificació per PCR (Promega).

pET-GK: constructe que conté el cDNA de *GCK* de fetge d'orada creat per Caseras (2001). S'ha utilitzat com a motllo per amplificar la *GCK* per PCR.

2.1.5 OLIGONUCLEÒTIDS

2.1.5.A Oligonucleòtids utilitzats per amplificar fragments de GCK d'orada per PCR

GK1: 5' CCGTGTGATGCTGGTGAAGG 3' (F)

Correspon als nucleòtids 384 a 403 del cDNA de *GCK* d'orada.

GK2R: 5' GGAGAAGGTGAAACCGAGAGG 3' (R)

Correspon als nucleòtids 585 a 565 del cDNA de *GCK* d'orada.

ME0001: 5' CCGCAGGTTTACTAAATGAGCC 3' (R)

Correspon als nucleòtids 94 a 72 del cDNA de *GCK* d'orada.

ME0004: 5' GCCTCGGTATGTGTCTCTAGGTGTGTGG 3' (R)

Correspon als nucleòtids 51 a 78 del cDNA de *GCK* d'orada.

ME0104: 5' GCGAATTCAGCTCTCAACTCGACCAGATGGTG 3' (F)

Correspon als nucleòtids 109 a 132 del cDNA de *GCK* d'orada. Els nucleòtids subratllats corresponen a la diana *EcoRI*.

ME0105: 5' GCGAATTCGACCAGCTGGTGAAAAATGCC 3' (F)

Correspon als nucleòtids 121 a 140 del cDNA de *GCK* d'orada. Els nucleòtids subratllats corresponen a la diana *EcoRI*. La mutació generada s'assenyala en negreta i doblement subratllada.

ME0107: 5' CTCCTAAATTCAGACCCAC 3' (F)

Correspon als nucleòtids -606 a -587 corrent amunt de l'inici de transcripció del gen *GCK* d'orada.

ME0202: 5'-CCCCCGGCCTTTACGTGCGG-3' (F)

Correspon als nucleòtids -72 a -56 corrent amunt de l'inici de transcripció del gen *GCK* d'orada. Els nucleòtids subratllats corresponen a la diana *SmaI*.

ME0310:

5' CCCCCGGCCTTTACGTGCGGTGTATAAATAAACTTCACCTGAGCATAAAAAACAG 3' (F)

Correspon als nucleòtids -72 a -22 corrent amunt de l'inici de transcripció del gen *GCK* d'orada. Els nucleòtids subratllats corresponen a la diana *SmaI*. S'assenyalen en negreta i doblement subratllades les mutacions generades.

ME0404: 5' CCCGGATCACCAGATGGGGCGAGATCGGGG 3' (F)

Correspon als nucleòtids -105 a -80 corrent amunt de l'inici de transcripció del gen *GCK* d'orada. Els nucleòtids subratllats corresponen a la diana *SmaI*.

Mi0104: 5' CCCGGGTGTGTTAGATGGGGCGAGATCGGGG 3' (F)

Correspon als nucleòtids -105 a -80 corrent amunt de l'inici de transcripció del gen *GCK* d'orada. La diana per l'enzim *SmaI* està subratllada. Les mutacions generades apareixen en negreta i doblement subratllades

Mi0201:

5'GGCTCATTTAGTCAAACCTGCGGAGATGCCGTGTGTCAGCTCTCAACTCGACCAGATGGTGAAACTGCCTTGCAGCTACAGC 3' (F)

Correspon als nucleòtids 72 a 153 del cDNA de *GCK* d'orada. La mutació generada s'assenyala en negreta i doblement subratllada.

Mi0303: 5' GGAATTCCGTGTGTCAGCTC 3' (F)

Correspon als nucleòtids 99 a 112 del cDNA de *GCK* d'orada. La diana per l'enzim *EcoRI* està subratllada.

ProGB1: 5' CTGGATCCTCAGGCTTGCTCATTGCACGG 3' (R)

Correspon als nucleòtids 1540 a 1560 del cDNA de *GCK* d'orada. La diana per l'enzim *BamHI* està subratllada. El codó de parada està assenyalat amb un quadre.

2.1.5.B Oligonucleòtids utilitzats per amplificar fragments de *GCK* de rata per PCR

ME0503: 5' GCTCCCTCCTCTCCGGAGGC 3' (R)

Correspon als nucleòtids 89 a 109 del cDNA de *GCK* hepàtica de rata.

ME0504: 5' GGGGTCGTTGGGGAAGTAGAG 3' (F)

Correspon als nucleòtids -1418 a -1399 corrent amunt de l'inici de transcripció del gen *GCK* de rata.

2.1.5.C Oligonucleòtids utilitzats en els assajos de retardació en gel

Es mostren els oligonucleòtids *forward*.

GK-56/-37: 5' TGTGGCCAGCCCACTTCACC 3' (F)

Correspon als nucleòtids -56 a -37 corrent amunt de l'inici de transcripció del gen *GCK* d'orada.

GK-56/-37mutSp: 5' TGTATAAAATAAACTTCACC 3' (F)

Correspon als nucleòtids -56 a -37 corrent amunt de l'inici de transcripció del gen *GCK* d'orada, amb la caixa d'unió a Sp mutada (indicada amb negreta i doblement subratllada).

GK-111/-93: 5' CCCACGATCACCAGATGG 3' (F)

Correspon als nucleòtids -111 a -93 corrent amunt de l'inici de transcripció del gen *GCK* d'orada.

GK-111/-93mutSRE: 5' CCCACGTGTGTTAGATGG 3' (F)

Correspon als nucleòtids -111 a -93 corrent amunt de l'inici de transcripció del gen *GCK* d'orada, amb la caixa SRE mutada (nucleòtids en negreta i doblement subratllats).

Sp1-cons: 5'-AAGAGGGTGGGCGGGAGCAACCA-3' (F)

Oligonucleòtid control d'unió a Sp1.

SREBP-cons: 5' ATCTGATCACGTGATCGAGGAG 3' (F)

Oligonucleòtid control d'unió a SREBP-1.

2.1.5.D Oligonucleòtids proveïts per kits comercials

Nested adaptor primer (AP2) (proveït pel kit *Universal GenomeWalker*, Clontech):

5' ACTATAGGGCACGCGTGGT 3'

Nested Universal Primer (NUP; 10 μM) (proveït per *SMART RACE 5' cDNA Amplification Kit*, Clontech):

5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'

Outer adaptor primer (AP1) (proveït pel kit *Universal GenomeWalker*, Clontech):

5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'

5'-RACE CDS (proveït per *SMARTTM RACE 5' cDNA Amplification Kit*, Clontech):

5' (T)25N-IN 3'

SMART II A Oligonucleotide (proveït per *SMARTTM RACE 5' cDNA Amplification Kit*, Clontech):

5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'

Universal Primer Mix A (UPM) 10X (proveït per *SMARTTM RACE 5' cDNA Amplification Kit*, Clontech):

Llarg (0.4 μM):

5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'

Curt (2 μM):

5' CTAATACGACTCACTATAGGGC 3'

2.1.5.E Oligonucleòtids de vectors

GLP2: 5' CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA 3' (R)

Oligonucleòtid del vector pGL3-Basic.

RVP3: 5' CTAGCAAAATAGGCTGTCCC 3' (F)

Oligonucleòtid del vector pGL3-Basic.

SP6: 5' GATTTAGGTGACACTATAG 3' (R)

Oligonucleòtid del promotor Sp6, present en els vectors pGEM-Teasy i pcDNA₃.

T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' (F)

Oligonucleòtid del promotor T7, present en els vectors pGEM-Teasy i pcDNA₃.

2.1.5.F Oligonucleòtids utilitzats per amplificar un fragment de β -actina d'orada per PCR

BA0199: 5' CCGTGTGATGCTGGTGAAGG 3' (F)

BA0299: 5' GACCTGTCCGTCGGGCAGCTC 3' (R)

2.1.6 ANTICOSSOS UTILITZATS

2.1.6.A Anticossos utilitzats per als assajos de Western blot i per a la immunoprecipitació de cromatina

Anti-GCK hepàtica de rata (Santa Cruz Biotechnology, referència SC7908). Anticòs policlonal dirigit contra 20 aminoàcids de l'extrem C-terminal de GCK de fetge de rata, obtingut a partir de conills (*rabbit* anti GCK); va ser utilitzat a una dilució 1/500 per immunodetectar la GCK hepàtica d'orada.

Anti-Sp1 (PEP 2) (Santa Cruz Biotechnology, referència SC-59). Anticòs policlonal de conill obtingut contra una seqüència peptídica d'Sp1 de rata. Va ser utilitzat a una dilució 1/200.

Anti-Sp3 (D-20) (Santa Cruz Biotechnology, referència SC-644). Anticòs policlonal de conill obtingut contra una seqüència peptídica carboxi-terminal d'Sp3 humana. Va ser utilitzat a una dilució 1/200.

Anti-SREBP (H-160) (Santa Cruz Biotechnology, referència SC-8984). Anticòs policlonal de conill obtingut contra una proteïna recombinant corresponent als aminoàcids 41-200 de l'SREBP-1 humana. Va ser utilitzat a una dilució 1/200.

Anticòs secundari: (*Kit* ECL, Amersham) Anticòs provinent de mico, obtingut contra sèrum de conill. Va ser utilitzat a una dilució 1/5000.

Anti-GKRP. Cedit pel Dr. J. Guinovart (Bioquímica i Biologia Molecular (Biologia), Universitat de Barcelona, Espanya).

2.1.6.B Anticossos utilitzats pels assajos de súper retardació

Anti-Sp1 (Santa Cruz Biotechnology, referència SC-59 X).

Anti Sp-3 (Santa Cruz Biotechnology, referència SC-644 X).

2.2 MÈTODES

2.2.1 TÈCNIQUES GENERALS DE BIOLOGIA MOLECULAR

El material utilitzat per a la manipulació de DNA i RNA cal que sigui autoclavat per tal que les DNAses estiguin inactivades. Les solucions utilitzades es preparen amb aigua Milli-Q i s'esterilitzen mitjançant autoclau (30 minuts a 1,4 atm). Les solucions que contenen substàncies que poden degradar-se durant el procés

d'esterilització en autoclau s'esterilitzen per filtració, mitjançant la utilització de filtres Millipore de 0,22 µm de diàmetre de porus.

2.2.1.A Electroforesi de DNA

L'electroforesi en gels d'agarosa permet efectuar la separació de fragments de DNA. S'ha dut a terme seguint la metodologia descrita per Sambrook i col·l (1989). La concentració d'agarosa del gel determina la resolució dels fragments de DNA a separar. Rutinàriament hem utilitzat gels d'agarosa a l'1% (p/v) per separar fragments de DNA de 0.4 a 6 Kb. Per separar fragments més petits hem utilitzat gels fins al 3 % de concentració d'agarosa. La mobilitat dels fragments de DNA és inversament proporcional al logaritme de la seva mida.

La visualització dels fragments de DNA en el gel l'hem dut a terme mitjançant la incorporació de bromur d'etidi (Sigma) en el gel d'agarosa, i efectuant l'observació en un transil·luminador amb llum UV.

S'han fet servir com a marcadors els fragments de DNA obtinguts per digestió del fag λ amb els enzims de restricció *EcoRI* i *HindIII* (*λEcoRI-HindIII*, Promega G1731); aquests marcadors de DNA presenten mides entre 21000 i 125 pb. Alternativament, s'han emprat els marcadors *1 Kb ladder* (Biotools), que inclouen fragments de DNA de 10000 a 250 pb, o bé de 100 pb (Gibco 15628-019) amb fragments diferenciats de manera escalonada cada 100 pb.

El tampó de càrrega de les mostres, que s'afegeix al DNA abans de l'electroforesi, conté glicerol, que dóna densitat a les mostres facilitant així la càrrega de les mostres als pous del gel, i blau de bromofenol que permet la visualització del front en el procés d'electroforesi.

L'electroforesi es realitza a 100 V i a temperatura ambient.

Preparació del gel d'agarosa:

1. Pesar la quantitat d'agarosa desitjada.
2. Dissoldre l'agarosa en TAE 1X escalfant al microones. Afegir aigua destil·lada per compensar les pèrdues produïdes per l'evaporació.
3. Afegir el bromur d'etidi (50 µg/100 ml) una vegada estigui refredada la solució d'agarosa.
4. Abocar la barreja al portagels prèviament segellat pels extrems, i col·locar les pintes per tal de formar els pouets.
5. Deixar solidificar el gel i retirar les pintes.

SOLUCIONS:

Tampó d'electroforesi de DNA: TAE 1X

Tris HCl	0,04 M
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	2 mM

S'hi afegeixen 57,1 ml/L de solució d'àcid acètic glacial.
S'ajusta el pH a 8, s'enrasa el volum a 1 litre i s'autoclava.
Es conserva a temperatura ambient.

Bromur d'etidi: Es prepara a una concentració de 10 mg/ml i es guarda a 4°C en un envàs hermètic i protegit de la llum. S'ha de manipular amb precaució, perquè és sospitós de ser carcinogen. El material contactat amb bromur d'etidi s'ha descontaminat seguint les indicacions descrites a *Current protocols in Molecular Biology* (A.1H.22).

Solució de càrrega de mostres de DNA (6X)

Glicerol	30%
Blau de bromofenol	0,25%

Es guarda a 4 °C.

Aquest tampó s'afegeix en una proporció de 1:5 (v/v) a les mostres de DNA, que poden ser carregades directament als pous del gel sense necessitat de ser escalfades prèviament.

2.2.1.A.1 Purificació de fragments de DNA a partir del gel d'agarosa

La tècnica permet purificar fragments de DNA a partir de gels d'agarosa per utilitzar-los en experiments posteriors. S'ha utilitzat el kit comercial *QIAEX II Gel extraction kit* (Qiagen). El mètode està basat en la dissolució de la porció de gel d'agarosa, que conté el fragment de DNA a purificar, en una solució proveïda pel kit i que permet l'adsorció selectiva de DNA a una membrana de sílice. Posteriorment aquest DNA és rentat i eluït en condicions de baixa força iònica.

2.2.1.B Modificació enzimàtica del DNA

Per purificar el DNA modificat per acció enzimàtica, al final de cada un dels processos indicats a continuació, s'ha utilitzat el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche), o bé el kit *QIAEX II Gel extraction kit* (Qiagen).

2.2.1.B.1 Digestió enzimàtica

S'ha dut a terme mitjançant enzims de restricció, seguint les instruccions de les cases comercials i utilitzant els tamps proveïts per a cada enzim. Per efectuar les digestions, cada enzim requereix unes condicions de força iònica i temperatura específiques. Es recomana la utilització d'1 U d'enzim per 1 µg de DNA, incubant durant 1 hora a la temperatura adequada. Generalment, hem dut a terme les digestions en presència d'excés d'enzim de restricció (1-3 U per µg), sense superar mai el 10 % en relació al volum total de la reacció.

2.2.1.B.2 Defosforilació de DNA

Aquest procés permet hidrolitzar els grups fosfat de l'extrem 5' de la cadena de DNA, RNA, ribonucleòtids i desoxirribonucleòtids trifosfat. Per a aquesta finalitat s'utilitza fosfatasa alcalina d'intestí de vedella (CIAP). La CIAP és la fosfatasa alcalina més emprada perquè presenta elevada estabilitat, activitat específica molt elevada i és inactivada fàcilment escalfant a 70 °C durant 10 minuts. Vam emprar la CIAP en les lligacions de clonatges no dirigits per defosforilar el plasmidi prèviament a la lligació, i minimitzar així la recircularització del plasmidi, la qual cosa permet reduir els falsos positius (plasmidis sense insert) en els procediments de clonatge.

PROTOCOL:

1. Dissoldre el DNA en tampó de CIAP 1X (0.5µg DNA/10 µl).
2. Afegir 0.1 U/pmol CIAP (SIGMA) en cas d'extrems 5' protuberants. Per extrems 3' protuberants o roms afegir 1 U/pmol.
3. Incubar durant 30 minuts a 37 °C
4. Inactivar la fosfatasa durant 10 minuts a 75 °C.

2.2.1.B.3 Fosforilació del DNA

La fosforilació del DNA s'efectua amb la polinucleòtid quinasa del bacteriòfag T4 (PNK). La PNK catalitza la transferència del fosfat terminal de l'ATP a un grup hidroxil de l'extrem 5' del DNA i/o del RNA.

PROTOCOL:

1. Preparar en un tub els components de la reacció:

REACCIÓ	
DNA 5' defosforilat	20 pmol
Tampó quinasa	1 X
ATP	20 pmol
T4 polinucleòtid quinasa (Roche)	10 U
H ₂ O mQ	qsp 20 µl

2. Incubar a 37 °C durant 30 minuts.
3. Aturar la reacció col·locant el tub en gel.

2.2.1.B.4 Conversió d'extrems protuberants en roms

El fragment Klenow de la polimerasa de DNA i d'*E. Coli* té capacitat per generar extrems roms a partir d'extrems protuberants 5'. L'activitat polimerasa 5' a 3' del fragment Klenow permet, a partir d'un DNA motlle de doble cadena i desoxinucleòtids trifosfat, omplir (*fill-in*) els forats originats per enzims de restricció que generen extrems 5' protuberants, de manera que es creïn extrems roms. La conversió en extrems roms possibilita la lligació de d'extrems protuberants 5' no compatibles.

PROTOCOL:

1. Preparar en un tub els components de la reacció:

REACCIÓ	
DNA	1 µg
Tampó klenow	1 X
dNTPs 10mM	0,5 µl
DNA polimerasa Klenow	10 U
H ₂ O mQ	qsp 40 µl

2. Incubar a 37 °C durant 15 minuts.
3. Inactivar durant 10 minuts a 75 °C.
4. Purificar el DNA

El fragment *Klenow* presenta també activitat exonucleasa 3' a 5' (*chew-back*), de manera que té la capacitat de convertir un extrem 3' protuberant en rom en absència de nucleòtids. Aquesta activitat permet dur a terme el clonatge de fragments 3' protuberants no compatibles.

2.2.1.C Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

La tècnica de PCR (Saiki i col·l, 1988) s'utilitza per amplificar fragments de DNA a partir d'un DNA motlle. La zona a amplificar queda delimitada per dos oligonucleòtids (sentit i antisentit) que són complementaris a una seqüència coneguda. Aquests oligonucleòtids funcionen com a encebadors per a la síntesi de DNA per la DNA polimerasa. La utilització d'una DNA polimerasa termoestable permet que aquesta dugui a terme cicles successius de síntesi de DNA. En aquesta tesi s'han utilitzat les polimerases: Taq polimerasa (Biotools) i *Expand High Fidelity* (Roche).

La seqüència dels encebadors emprats depèn de les regions que envolten el fragment que es vol amplificar. De manera general, els encebadors han de ser el més específics possible, tenir entre 18 i 25 nucleòtids, presentar entre un 50%-70% de residus G/C i no formar dímers o estructures secundàries. Existeixen diversos programes informàtics que ajuden al disseny d'encebadors i al càlcul de les temperatures òptimes d'hibridació (*C primer*, *School of Medicine, Univ. of California, USA*).

El DNA motlle és desnaturalitzat per escalfament. Seguidament la barreja es refreda a la temperatura òptima per a què els oligonucleòtids hibridin amb les seves seqüències complementàries. Aquests actuaran com a iniciadors de la síntesi de noves cadenes per part de la DNA polimerasa. Aquesta etapa es realitza a 72 °C. Els productes, després d'un cicle complet, funcionaran com a motlle per a les successives reaccions. Al final, s'obtidran 2ⁿ molècules de DNA, sent *n* el número de cicles efectuats.

CONDICIONS D'AMPLIFICACIÓ:

1. Desnaturalització 94 °C 50 segons
2. Hibridació 50-60 ° C 30 segons (la temperatura depèn de l'oligonucleòtid utilitzat)
3. Extensió 72 °C (temps en funció de la longitud del fragment a amplificar; per a cada 1000 pb que es pretenen amplificar es requereix 1 minut aproximadament)
4. *n* cicles s'especifiquen a cada assaig
5. Extensió final 72 °C 5 minuts

REACCIÓ DE LA PCR	
DNA motlle	20-40 ng
Tampó de la Taq polimerasa	1X
Mg ₂ Cl	1-3 mM
dNTP	200 µM (de cada un dels quatre)
Oligonucleòtid <i>forward</i>	0.2 µM
Oligonucleòtid <i>reverse</i>	0.2 µM
Taq DNA polimerasa	1,5 U
H ₂ O mQ	qsp 50 µl

2.2.1.C.1 Purificació de productes de PCR

Per purificar els productes de PCR s'ha utilitzat el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). El procediment es basa en la unió selectiva de DNA a unes fibres de vidre, seguida de la realització d'una sèrie de rentats que eliminen cadenes de DNA de mida inferior a uns 150 pb, nucleòtids i sals contaminants. Finalment es procedeix a la posterior elució del DNA d'interès emprant una solució de baix contingut en sals.

La quantificació de DNA és espectrofotomètrica, tenint en compte que 1 unitat d'absorbància a 260 nm mesurada en cubeta de quars, equival a una concentració de DNA de 50 µg/ml:

$$\text{Concentració de DNA en } \mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260 \text{ nm}} \times 50 \times 1 / V_{\text{mostra } (\mu\text{l})}$$

Alternativament, es pot estimar la concentració de DNA lineal en una electroforesi per comparació amb marcadors de DNA que inclouen diferents fragments amb quantitats conegudes (apartat 2.2.1.A).

SOLUCIONS:

TE

Tris HCl 10 mM

EDTA 1 mM

S'ajusta a pH 8 i s'autoclava.

2.2.1.D Tècnica del passeig cromosòmic

Per tal de realitzar el clonatge del promotor de *GCK* hepàtica d'orada hem utilitzat el kit *Universal GenomeWalker* (Clontech). Aquest sistema permet trobar seqüències de DNA genòmic desconegudes adjacents a una seqüència coneguda, de manera que ens ha permès clonar el fragment adjacent a l'extrem 5' del cDNA que codifica per a la *GCK*.

Inicialment, per dur a terme aquest mètode, es va obtenir DNA genòmic de fetge de *Sparus aurata* utilitzant el *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Una vegada obtingut el DNA genòmic pur, es procedeix a la construcció de quatre llibreries de DNA, digerint quatre alíquotes de DNA amb un enzim de restricció diferent per a cadascuna (*Dra I*, *EcoR V*, *Pvu II*, *Stu I*). Aquests enzims generen extrems roms, fet que permet que als fragments resultants d'aquestes quatre llibreries se'ls pugui lligar un adaptador *GenomeWalker*, què conté les seqüències que permeten la hibridació amb els *adaptor primers* subministrats pel kit (AP1 i AP2).

PROTOCOL:

1. Incubar els components de la reacció durant tota una nit a 16 °C.

<u>REACCIÓ</u>	
DNA purificat i digerit	200 ng
Adaptador <i>Genome Walker</i>	25 µM
Tampó de lligasa 10x	1 X
T4 DNA lligasa (6 U/µl)	3 U

2. Aturar la reacció incubant a 70 °C durant 5 minuts.
3. Afegir a cada tub 72 µl de TE 1X
4. Mesclar durant 10-15 segons.
5. Una vegada construïdes les llibreries i lligats els adaptadors es realitzen per a cada llibreria dues amplificacions mitjançant la tècnica del PCR:
 - En la primera amplificació (PCR primari) utilitzem *outer adaptor primer* AP1, i un encebador específic de *GCK* (ME0001).
 - En el PCR secundari utilitzem el *nested adaptor primer* (AP2) i un encebador intern específic de *GCK* (ME0004).

El disseny dels encebadors per clonar el promotor del gen *GCK* s'ha dut a terme tenint en compte els següents requeriments:

- En la mesura que sigui possible l'encebador extern i l'intern no s'han de solapar.
- L'encebador ha de situar-se el més pròxim possible a l'extrem 5' del DNA conegut.

- La longitud del primer ha d'estar compresa entre 26-39 nt i contenir 40-60% de G/C, per assegurar que els encebadors tinguin una temperatura *melting* d'almenys 67 °C.
- S'han de dissenyar encebadors que no generin ponts d'hidrogen intramoleculars.
- Les seqüències a l'extrem 3' dels encebadors específics no han de ser capaces de lligar-se als extrems 3' dels *adaptor primers*.

CONDICIONS DE LES AMPLIFICACIONS:

L'amplificació primària es va realitzar seguint el programa de PCR:

5 cicles:	94 °C	30 segons
	72 °C	1 minut
32 cicles:	94 °C	25 segons
	67 °C	3 minuts
	67 °C	7 minuts

El PCR secundari es va realitzar a partir del PCR primari, en les condicions següents:

5 cicles:	94 °C	30 segons
	72 °C	3 minuts
20 cicles:	94 °C	25 segons
	67 °C	30 segons
	72 °C	2 minuts 30 segons
	72 °C	5 minuts

2.2.1.E Clonatge i lligació de fragments de DNA

Consisteix en la lligació de molècules de DNA d'origen diferent. El nou constructe obtingut estarà format pel fragment de DNA d'interès lligat a un vector. Per a les lligacions s'utilitza la DNA lligasa del bacteriòfag T4, què catalitza la formació d'enllaços fosfodiéster entre un fragment de DNA de doble cadena amb un fosfat 5' terminal i una altre extrem 3' hidroxil terminal.

Per dur a terme un clonatge, quan sigui convenient, caldrà efectuar reaccions de digestió, precipitació, fosforilació, desfosforilació, obtenció de DNA amb extrems roms. Aquestes tècniques s'han realitzat seguint els protocols descrits per Sambrook i col·l (1989) i a l'apartat 2.2.1.B.

PROTOCOL:

1. S'introdueixen en un tub eppendorf el fragment de DNA que volem clonar (insert) i el plasmidi. La relació molar utilitzada normalment entre insert i plasmidi és de 3:1. Les quantitats totals de DNA utilitzades en les lligacions han estat de 50-75 ng. Les lligacions s'han dut a terme en un volum final de 10 µl. S'afegeix 5 µl de tampó de lligació (*Rapid Ligation Buffer 2X*, T4 DNA lligasa, Promega), i 2U de l'enzim T4 DNA lligasa (2U/µl, Promega).
2. S'incuba la reacció a temperatura ambient durant 1 hora, i posteriorment a 4 °C tota la nit.
3. Cèl·lules bacterianes competents són transformades amb el producte de la lligació (apartat 2.2.1.F).
4. S'analitzen les colònies obtingudes per PCRpreps (apartat 2.2.1.G). S'utilitzen dos oligonucleòtids complementaris a la part del plasmidi situada immediatament anterior i posterior a l'insert clonat.
5. Una vegada detectades les colònies positives mitjançant l'anàlisi per PCR, es procedeix a aïllar el DNA plasmídic i al seu anàlisi amb enzims de restricció.

2.2.1.F Transformació de cèl·lules competents

La transformació és una tècnica que ens permet introduir DNA exogen circular (generalment el plasmidi que conté el DNA en estudi) en cèl·lules procariotes. Prèviament s'han de fer competents les cèl·lules procariotes.

2.2.1.F.1 Obtenció de cèl·lules d'*E. coli* competents

En condicions normals, l'eficiència de transformació d'*E. coli* és molt baixa, ja que aquests bacteris accepten l'entrada de molt poc DNA exogen. Per aquest motiu abans de dur a terme la transformació, cal sotmetre les cèl·lules a un tractament que incrementi la permeabilitat de la membrana, convertint-les així en cèl·lules competents, susceptibles de ser transformades amb més eficàcia. Hem utilitzat el procediment descrit per Sambrook i col·l (1989), que produeix l'alteració de la permeabilitat de les membranes cel·lulars mitjançant la utilització d'ions de calci.

PROTOCOL:

1. Inocular 3 ml de medi LB sense antibiòtics amb cèl·lules d'*E. coli* i mantenir-ho en agitació constant a 37 °C durant 12-15h.
2. Utilitzar 0,5 ml del cultiu obtingut per inocular 50 ml de medi LB autoclavat.
3. Deixar les cèl·lules a 37 °C, en agitació, unes 2-3 hores, fins que la OD_{590 nm} sigui 0,7-0,8, la qual cosa indica que el cultiu es troba en fase de creixement exponencial; no s'ha de deixar que la densitat arribi a 0,9.
4. Centrifugar les cèl·lules a 2500 g durant 10 minuts, per tal de sedimentar-les.
5. Eliminar el sobrenedant i resuspendre els bacteris en 50 ml de MgCl₂ 100 mM fred.
6. Centrifugar a 2500 g durant 10 minuts, per rentar les cèl·lules. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el precipitat, aquesta vegada en 10 ml del mateix MgCl₂ 100 mM fred.
7. Afegir 100 ml de CaCl₂ 100 mM i mantenir les cèl·lules en gel, durant 60-90 minuts.
8. Centrifugar 10 minuts a 2500 g i retirar el sobrenedant.
9. Resuspendre les cèl·lules en 12,5 ml de la solució de resuspensió.
10. Fer alíquotes de 200 µl de cèl·lules i congelar-les immediatament a -80 °C.

SOLUCIONS:

Medi LB:

Triptona	10 g/l
Extracte de llevats	5 g/l
NaCl	10 g/l
S'ajusta el pH a 7 i s'autoclava.	

Solució de resuspensió

CaCl ₂	85 mM
Glicerol	15%
S'autoclava.	

2.2.1.F.2 Transformació per xoc tèrmic

La transformació produeix l'alteració transitòria de la permeabilitat de la membrana de cèl·lules competents, per tal de facilitar l'entrada de DNA. Les transformacions s'han efectuat pel mètode del xoc tèrmic (Sambrook i col·l, 1989).

PROTOCOL:

1. Descongelar en gel (0-4 °C) una alíquota de cèl·lules competents.
2. Barrejar les cèl·lules i el DNA plasmídic en una proporció ≥10: 1 (v/v) i mantenir la barreja 10 minuts en gel.
3. Incubar 3 minuts a 42 °C.
4. Mantenir la barreja 10 minuts en gel.
5. Afegir 800 µl de medi LB autoclavat i incubar 45 minuts en agitació a 37 °C. Durant aquest interval, les cèl·lules refan les membranes i sintetitzen les proteïnes de resistència a antibiòtics codificades pel plasmidi.
6. Centrifugar a 10000 g durant 1 minut a temperatura ambient en centrífuga de sobretaula. Retirar el sobrenedant, guardant-ne 200 µl per resuspendre les bacteries sedimentades.
7. Sembrar les plaques corresponents i mantenir-les posteriorment a 37 °C en estufa, durant 12-15 hores.

SOLUCIONS:

Medi LB

Es prepara seguint les pautes de l'apartat 2.2.1.F.1. En cas necessari s'hi afegeix ampil·lina a una concentració final de 100 µg/ml abans d'inocular la corresponent colònia resistent.

Ampicil·lina

Es prepara 100 mg/ml (1000 X) i es conserva aliquidada i congelada a -20 °C.

Plaques d'LB-agar

Triptona	10 g/l
extracte de llevats	5 g/l
NaCl	1 g/l
bacto agar	1,5 g/l

Pesar triptona, extracte de llevat i NaCl, i dissoldre'ls en H₂O mQ. Ajustar el pH a 7. Afegir el bacto agar i autoclavar. Deixar refredar el medi fins a 50 °C i preparar les plaques a la campana. Una vegada solidificat el medi, mantenir les plaques una nit cap per avall en estufa a 37 °C, per tal d'assecar-les i comprovar que no estan contaminades. Guardar-les a 4 °C fins a ser utilitzades.

Tetraciclina

Es prepara una solució de 100 mg/ml en etanol i es guarda aliquidada a -20 °C, protegida de la llum.

IPTG

Es prepara una solució de 100 mM i es guarda aliquidat i protegit de la llum a -20 °C.

X-gal

Es prepara a concentració de 50 mg/ml en DMF (dimetilfluorur) i es conserva aliquidat a -20 °C.

La utilització de plasmidis que presenten les dianes de clonatge interrompent el gen *lac-Z*, permet la selecció per color de colònies blanques, a partir de plaques d'LB-agar amb IPTG i X-gal. El fonament d'aquesta selecció consisteix en què les colònies blaves contenen el gen *lac-Z* sencer i no inclouen cap insert, mentre que les colònies blanques, en canvi, presenten un insert clonat que interromp el gen *lac-Z*, i per tant, no generen color.

2.2.1.G PCR preps

Aquesta tècnica consisteix en emprar la reacció de PCR per tal d'analitzar les colònies obtingudes (McPherson i col·l, 1991). La utilització dels oligonucleòtids adequats ens permet amplificar un fragment del plasmidi incorporat, i detectar així la presència, o no, de l'insert clonat. En comptes de partir del DNA motlle partim de les colònies obtingudes en la transformació. Aquelles colònies en què mitjançant la reacció de PCR es detecta la incorporació de l'insert s'analitzaran, posteriorment, per restricció enzimàtica. Per tal de realitzar aquest anàlisi caldrà prèviament obtenir el DNA plasmídic.

2.2.1.H Obtenció de DNA plasmídic

Els diversos protocols que existeixen per aïllar plasmidis a partir de cultius bacterians es basen en una lisi inicial de les bacteries, seguida d'una etapa que permet precipitar proteïnes i el genoma bacterià. Per últim es purificarà el DNA plasmídic per precipitació o bé utilitzant alguna tècnica de tipus cromatogràfic (mitjançant columnes o resines disponibles comercialment). Hem utilitzat diferents mètodes en funció de la quantitat de DNA requerit. S'han realitzat minipreparacions (minipreps) per a finalitats analítiques, midipreparacions (midipreps) i maxipreparacions (maxipreps) en cas de necessitar grans quantitats de DNA. Aquestes metodologies es diferencien també pel volum de cultiu de partida, en cas de minipreps es parteix de 2-4 ml de cultiu bacterià, de 50-200 ml per a midipreps i 500 ml per a maxipreps.

2.2.1.H.1 Minipreps

S'han realitzat seguint el mètode de lisi alcalina. El fonament del mètode es basa en efectuar una lisi alcalina de les bacteries i la precipitació selectiva del DNA genòmic d'alt pes molecular i les proteïnes desnaturalitzades per l'acció d'una solució d'acetat potàssic, posteriorment es precipita el DNA plasmídic.

Una vegada realitzades les digestions enzimàtiques del DNA, se seleccionarà la colònia d'interès i se'n prepararà un estoc de cèl·lules amb glicerol al 50%. L'estoc es manté congelat a -80 °C.

Alternativament, per dur a terme aquesta metodologia hem utilitzat kits comercials com el *GenElute Plasmid Miniprep Kit* (Sigma). El fonament d'aquest mètode es basa en la lisi alcalina de les cèl·lules, seguida de la precipitació de DNA genòmic i proteïnes, i la posterior purificació del DNA plasmídic mitjançant la utilització de columnes de sílica.

PROTOCOL:

1. Passar 1,5 ml del cultiu, prèviament crescut a 37 °C en agitació constant durant 8-15 hores a un tub eppendorf. Guardar la resta del cultiu a 4 °C.
2. Centrifugar el cultiu a 10000 g durant 30 segons, per sedimentar els bacteris.
3. Resuspensar el precipitat de bacteris en 54 µl de la solució I.
4. Afegir 120 µl de la solució II de lisi; mesclar per inversió i deixar-ho 5 minuts a temperatura ambient.
5. Afegir 90 µl de solució III freda; mesclar per inversió i deixar-ho 10 minuts en gel.
6. Centrifugar a 10000 g, durant 15 minuts i passar el sobrenedant a un tub eppendorf.
7. Afegir 0,6 volums d'isopropanol i deixar la barreja 5 minuts a temperatura ambient.
8. Centrifugar 15 minuts a 10000 g i eliminar el sobrenedant.
9. Rentar el precipitat amb 200 µl d'etanol al 70 %, centrifugant durant 5 minuts.
10. Deixar assecat el precipitat i ressuspensar-lo en 25 µl de la solució d'RNAsa A en TE pH 8.
11. Incubar 30 minuts a 37 °C, per digerir l'RNA.
12. Analitzar els plasmidis obtinguts mitjançant digestió enzimàtica.

SOLUCIONS:

Solució I

Glucosa	50 mM
Tris HCl pH 8	25 mM
EDTA pH 8	10 mM

Solució II

NaOH	0,2 M
SDS	1 %
Solució extemporània	

Solució III

Acetat potàssic	3 M
Àcid acètic glacial	5 M

RNAsa A en TE pH 8

El TE es prepara tal com es detalla en l'apartat 2.1.3.A

2.2.1.H.2 Midipreps i Maxipreps

El fonament del mètode és una lisi alcalina del cultiu cel·lular, seguida d'una purificació mitjançant columna. Les midipreps han estat efectuades segons el protocol descrit en *GenElute™ Plasmid Midiprep Kit* (Sigma), i les maxipreps seguint el protocol descrit en *Genopure Plasmid Maxi Kit* (Roche). Hem utilitzat aquestes tècniques per obtenir quantitats importants de plasmidi (fins a 500 µg).

2.2.1.I Seqüenciació del DNA

En els experiments descrits en aquesta memòria, la seqüenciació del DNA plasmídic s'ha dut a terme de manera automatitzada, als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

S'ha utilitzat el *kit* de seqüenciació *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). El protocol es basa en fer una reacció de PCR a partir del DNA que es vol seqüenciar, en presència de ddNTP marcats, cada un d'ells, amb un indicador fluorescent de longitud d'ona diferent, i amb els oligonucleòtids (sentit i antisentit) adequats per amplificar la seqüència d'interès.

REACCIÓ DE LA PCR		CONDICIONS D'AMPLIFICACIÓ:	
<i>Mix terminator</i> (proveït pel kit)	3µl	1.	96 °C 1 minut 30 segons
Oligonucleòtids (10µM)	5 pmol	2.	96 °C 30 segons
DNA a seqüenciar	0.5 µg	3.	50 °C 30 segons
H ₂ O mQ	qsp 10 µl	4.	60 °C 4 minuts
		5.	30 cicles a partir de la 2 ^a etapa

Les cadenes sintetitzades són precipitades, rentades i assecades.

PROTOCOL:

1. A un tub de 1,5 ml afegir 60 µl d'etanol absolut, 10 µl d'aigua mQ estèril i el contingut del tub de la reacció de seqüenciació (10 µl). Mesclar.
2. Deixar precipitar 15 minuts.
3. Centrifugar 20 minuts a 10000 g i eliminar la solució d'etanol absolut.
4. Afegir 200 µl d'etanol 70 %, centrifugar 5 minuts a 10000 g i retirar el sobrenedant.
5. Repetir la última etapa 2 vegades.
6. Deixar assecar el precipitat a temperatura ambient durant 15 minuts.
7. Posteriorment aquestes cadenes són analitzades de forma automatitzada per electroforesi en un sistema acoblat a un fluorímetre al Servei de Seqüenciació (Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona).

2.2.1.J Anàlisi informàtica i introducció de seqüències en bases de dades

L'anàlisi informàtica de les seqüències de DNA i proteïnes s'ha dut a terme utilitzant les bases de dades *Genbank*, *GenEMBO*, *SwissPROT* i emprant el paquet de programes *Genetics Computer Group (Wisconsin Package Version 10.0, GCG, Madison, Wisc)*. Alternativament, també s'ha recorregut a altres programes accessibles a través d'Internet.

2.2.1.K Tècnica d'RT-PCR

Aquesta tècnica implica una primera etapa, catalitzada per la transcriptasa reversa (RT), en què se sintetitza una cadena senzilla de DNA a partir de l'RNA inicial. Una vegada s'obté el cDNA s'efectua una amplificació per PCR d'una regió determinada compresa entre dos oligonucleòtids, tal i com s'indica a l'apartat 2.2.1.C. L'RT és una DNA polimerasa RNA-depenent, que requereix, a part de l'RNA motlle, dNTPs i hexàmers aleatoris.

La reacció té lloc a 37 °C, durant 60 minuts. La presència d'RNA en les mostres exigeix extremar les precaucions per evitar l'acció de les RNAases; s'ha d'utilitzar, per tant, material autoclavat i s'han d'efectuar totes les manipulacions amb guants. A més, s'inclou en la reacció un inhibidor d' RNAases.

REACCIÓ DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA		
Tampó per la RT 5X (Life Technologies)	4 µl	SOLUCIONS: <u>H₂O DEPC</u> DEPC 0,1 ml H ₂ O 100 ml
dNTP	10 µM	
Hexàmers aleatoris	125 ng	
Inhibidor d'RNAases	40 U	
RNA total o poli(A) ⁺	1 µg o 0,1 µg	
MMLV-RT	200 U	
H ₂ O _{DEPC}	qsp 20 µl	

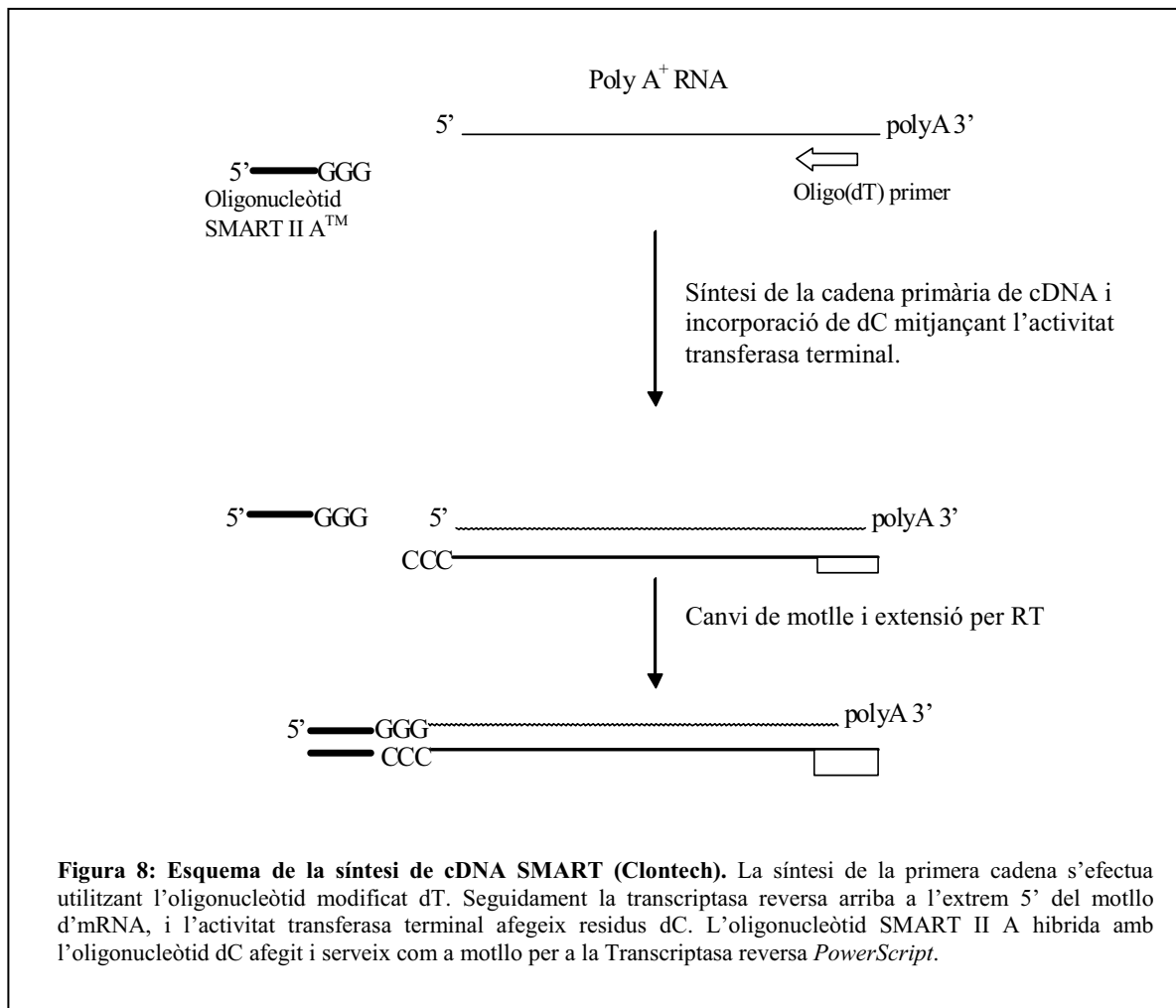
Com a inhibidor d'RNAases s'ha emprat RNasin® 40 U/µl (Promega). L'RT utilitzada prové de Life Technologies (*Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase*, 200 U/µl).

El DEPC (dietilpirocarbonat) s'ha de manipular en campana de gasos, perquè és un tòxic molt volàtil. L'H₂O_{DEPC} s'autoclava dues vegades. El DEPC és un potent inhibidor d'RNAases; la quantitat que no queda dissolta en l'H₂O es degrada a CO₂ per acció de la calor de l'autoclau.

2.2.2 SMART RACE 5' cDNA AMPLIFICATION KIT (CLONTECH)

La utilització d'aquest *kit* permet determinar la seqüència de l'extrem 5' d'un mRNA utilitzant la tecnologia de síntesi de cDNA SMART (*Switching Mechanism At 5' ends of RNA Transcript*) acoblada amb la tècnica RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) descrita per Frohmann i col·l (1989). L'SMART RACE incrementa la sensibilitat i redueix el soroll de fons, i permet utilitzar RNA total o poli A⁺ com a material de partida per a la síntesi del cDNA. Aquesta tecnologia permet generar cadenes de cDNA en reaccions portades a terme amb la transcriptasa reversa. (Zhu i col, 2001). El procés es fa possible gràcies a l'acció conjunta de l'oligonucleòtid SMART II A i la transcriptasa reversa *PowerScript*, que en arribar a l'extrem 5' del motlle de RNA, mitjançant la seva activitat transferasa terminal, afegeix de 3 a 5 residus dC a l'extrem 3' terminal de la cadena de cDNA sintetitzada inicialment (figura 8). L'oligonucleòtid SMART II A, proveït pel *kit*, conté residus dG que hibriden amb la regió rica en C de la cua del cDNA sintetitzat, i serveix com a motlle per a la transcriptasa reversa. A partir del RNA original es genera una còpia completa del cDNA amb la seqüència SMART al final. Aquesta tècnica només donarà lloc a posterior amplificació específica per PCR quan la transcriptasa reversa hagi arribat a l'extrem 5' del missatger. El cDNA obtingut és sintetitzat utilitzant un oligonucleòtid (dT) anomenat 5'-RACE CDS *Primer* (5'-CDS) i l'oligonucleòtid SMART II A. L'oligonucleòtid dT conté dos nucleòtids degenerats a l'extrem 3'. Aquests nucleòtids posicionen l'encebador a l'inici de la cua poli-A. La cadena de cDNA obtinguda és utilitzada en reaccions RACE PCR amb oligonucleòtids específics. EL *kit* proporciona dos encebadors que s'hibriden a l'adaptador sintètic. Amb aquests dos encebadors i uns altres dos específics per a *GCK* es realitzen les reaccions 5'-RACE PCR.

Els únics requeriments per a l'amplificació amb SMART RACE cDNA és conèixer un fragment de la seqüència d'interès per tal de dissenyar oligonucleòtids específics.



2.2.2.A Disseny d'oligonucleòtids

Els encebadors específics del gen a estudiar han de tenir una longitud compresa entre 23 i 28 nucleòtids, ha de contenir un 50-70% de GC, i la T_m ha de ser d'almenys 65 °C. Una T_m de més de 70 °C podria generar resultats més satisfactoris i permetria realitzar *touch down* PCR (cicles inicials d'amplificació a una temperatura d'hibridació elevada i es redueix progressivament aquesta temperatura en els cicles següents).

Cal evitar la utilització d'oligonucleòtids que generin ponts d'hidrogen intramoleculars, i d'oligonucleòtids que tinguin seqüències complementàries als *Universal primer mix* (UPM).

2.2.2.B Síntesi de la primera cadena de cDNA

PROTOCOL:

1. Mesclar en un tub eppendorf els components de reacció:

REACCIÓ	
RNA poli(A) ⁺	1-3 µl
5'-CDS <i>primer</i>	1 µl
DNA a seqüenciar	1 µl
H ₂ O mQ	qsp 5µl

1. Incubar els tubs a 70 °C durant 2 minuts.
2. Refredar els tubs en gel durant 2 minuts.
3. Afegir al tub de reacció:

Tampó <i>first-strand</i> 5X	2 µl
DTT (20 mM)	1 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl
Transcriptasa reversa <i>PowerScript</i>	1 µl
H ₂ O mQ	qsp 10µl

4. Incubar els tubs de reacció a 42 °C durant 90 minuts.
5. Diluir la reacció amb tampó TE.
6. Escalfar els tubs a 72 °C durant 7 minuts.
7. Les mostres poden ser emmagatzemades a -20 °C durant 3 mesos.

El RNA poli(A)⁺ de partida, preparat segons l'apartat 2.2.4.A, procedia del fetge d'orades alimentades amb dietes riques en carbohidrats.

2.2.2.C Purificació del cDNA

La purificació s'efectua seguint les indicacions del *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

2.2.2.D Amplificació 5' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

A) AMPLIFICACIÓ PRIMÀRIA:

S'efectua un PCR amb 0,75 µl del cDNA en estudi; s'utilitza l'oligonucleòtid *Universal Primer Mix A* (UPM) proveït pel *kit* conjuntament amb l'encebador específic ME0001 de la seqüència de la *GCK* en estudi.

L'amplificació primària no sol conduir a l'obtenció d'un producte definit, per la qual cosa, generalment és necessària una amplificació secundària.

Mescla de PCR (<i>Master Mix</i>)	
<i>Advantage 2 PCR Buffer 10X</i>	1,5 µl
dNTP mix (10 mM)	0,3 µl
<i>Advantage 2 Polymerase Mix</i>	0,3 µl
H ₂ O mQ	qsp 12,45µl

REACCIÓ DE PCR	
cDNA de <i>GCK</i> preparat per 5'RACE	0,75 µl
<i>UPM</i>	1,5 µl
ME0001 (10 µM)	0,3 µl
<i>Master mix</i>	12,5 µl

CONDICIONS DE L'AMPLIFICACIÓ:

L'amplificació primària es va realitzar mitjançant *touchdown-PCR*.

5 cicles:	94 °C	1 minut 30 segons
	72 °C	1 minut
5 cicles:	94 °C	30 segons
	70 °C	30 segons
	72 °C	1 minut
20 cicles:	94 °C	30 segons
	67 °C	30 segons
	72 °C	1 minut

B) AMPLIFICACIÓ SECUNDÀRIA

L'amplificació secundària es realitzar utilitzant 1-2 µl de la reacció del PCR primari (diluït 1/25). S'utilitza l'oligonucleòtid *Nested Universal primer (NUP)* del *kit*, conjuntament amb l'encebador específic per a *GCK*, ME0004, situat més cap a l'extrem 5' que ME0001.

REACCIÓ DE PCR	
cDNA de <i>GCK</i> preparat per 5'RACE	0,75 µl
<i>NUP</i>	1,5 µl
ME0004 (10 µM)	0,3 µl
<i>Master mix</i>	12,5 µl
H ₂ O mQ	0.25 µl

CONDICIONS DE L'AMPLIFICACIÓ:

El PCR secundari es va realitzar a partir del PCR primari, es van dur a terme 35 cicles en les condicions següents:

94 °C	30 segons
68 °C	30 segons
72 °C	3 minuts

Els productes de PCR són visualitzats en un gel d'agarosa al 2%. Per tal de determinar l'origen de transcripció, els fragments obtinguts són seqüenciats després de ser clonats en el vector pGEM-Teasy.

2.2.3 TRANSCRIPCIÓ/TRADUCCIÓ *IN VITRO*

Aquesta tècnica consisteix a sintetitzar proteïnes *in vitro*, partint d'un cDNA clonat sota el control del promotor SP6, T3 o T7 de la RNA polimerasa. L'RNA resultant de la transcripció és posteriorment traduït a proteïna. Amb aquest mètode es pretén comprovar si el cDNA dona lloc a un RNA capaç de generar una proteïna. Quan la tècnica s'efectua en presència de L-³⁵S metionina, l'electroforesi i posterior autoradiografia del gel permeten visualitzar les proteïnes sintetitzades i estimar-ne el pes molecular.

Es va utilitzar el *kit El TnT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega), que redueix les manipulacions i simplifica el protocol a seguir, ja que transcripció i traducció tenen lloc de manera acoblada, al mateix tub. La barreja única de reacció conté RNA polimerasa, nucleòtids, sals i inhibidor d'RNAases necessaris per a la transcripció, així com aminoàcids i la solució de lisat de reticulòcits de conill responsable de la traducció. La solució proporcionada pel *kit* no conté metionina. Si s'utilitza L-³⁵S metionina s'obté una proteïna marcada radioactivament que permet efectuar un seguiment del procés.

La L-³⁵S metionina utilitzada en els experiments de transcripció/traducció *in vitro* descrits procedia d'*Amersham* (18,5 Bq; 500 mCi, >1000 Ci/mmol).

L'obtenció de proteïnes mitjançant la tècnica de transcripció/traducció *in vitro*, per efectuar assajos de retardació en gel (veure apartat 2.2.6) es va dur a terme amb metionina no marcada radioactivament.

PROTOCOL

1. Descongelar ràpidament la mescla de reacció del *kit* i mantenir-la en gel.
2. Preparar la reacció en un tub eppendorf:

REACCIÓ	
Mix de reacció del <i>kit</i>	40 µl
L- ³⁵ S metionina	2 µl
DNA	1 µg
H ₂ O lliure d'RNAses	qsp 50 µl

3. Incubar la barreja a 30 °C durant 90 minuts.
4. Dur a terme una electroforesi en gel de poliàcrilamida al 10%, carregant a cada carril mostres amb 2-5 µl de la barreja de reacció de transcripció/traducció *in vitro*.
5. Assecar el gel i posar-lo en contacte amb una pel·lícula *Hyperfilm* (Amersham), proveïda amb un casset intensificador, a temperatura ambient.

2.2.4 NORTHERN BLOT

La tècnica de *Northern blot* permet detectar i quantificar específicament nivells d'mRNA. Es basa en la hibridació d'una sonda (un fragment de DNA marcat) amb RNA transferit i fixat a una membrana de niló o nitrocel·lulosa. El protocol implica: preparació de les mostres de teixits o cèl·lules per aïllar l'RNA, obtenció de la sonda marcada, electroforesi d'RNA en gel d'agarosa, transferència de l'RNA a una membrana de niló o nitrocel·lulosa i posterior fixació, hibridació amb la sonda específica i detecció.

2.2.4.A Aïllament d'RNA

Per realitzar l'extracció d'RNA total a partir de teixit hepàtic pulveritzat hem utilitzat el *kit* comercial *Total quick RNA cell and tissues* (Talent).

Una vegada finalitzat el protocol d'extracció d'RNA s'efectua la quantificació i s'examina la possible existència de contaminants llegint l'absorbància a 260 nm i 280 nm. Addicionalment, se'n comprova la seva qualitat efectuant una electroforesi en gel d'agarosa. Conservar els RNA a -80 °C, descongelar-los lentament en gel cada vegada que s'hagin d'utilitzar.

De manera similar a la quantificació del DNA, per quantificar l'RNA s'ha de tenir en compte que 1 unitat d'absorbància a 260 nm, mesurada en cubeta de quars, equival a una concentració de 44 µg/ml:

$$\text{Concentració d'RNA en } \mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260\text{ nm}} \times 44 \times 1 / V_{\text{mostra}} (\mu\text{l})$$

Relacions d'absorbància $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ inferiors a 1,7 indiquen que l'RNA podria estar contaminat amb proteïnes.

2.2.4.B Electroforesi d'RNA

Com en el cas del DNA, l'electroforesi d'RNA s'ha realitzat seguint el protocol de Sambrook i col·l (1989), en gels d'agarosa a l'1% en condicions desnaturalitzants. De manera general, el procés d'electroforesi s'efectua a 40 V i a temperatura ambient, durant 3 o 4 hores. Una cop finalitzada l'electroforesi comprovem al transil·luminador de llum UV la migració i l'estat de les mostres.

2.2.4.B.1 Preparació de les mostres

Les mostres d'RNA són diluïdes, si convé, amb H₂O_{DEPC} o TE/SDS 0,1 %. Se'ls afegeix el tampó de càrrega de mostres i s'incuben durant 10 minuts a 65 °C per tal de desfer possibles estructures secundàries en les molècules d'RNA. El bromur d'etidi del tampó de càrrega, permet visualitzar els àcids nucleics a l'UV.

Deixem les mostres en gel fins al moment de aplicar-les en el gel d'agarosa.

SOLUCIONS:

Tampó de càrrega de mostres d'RNA

MOPS 10X	21,6 % (v/v)
Formaldehid	17,5 % (v/v)
Formamida desionitzant	48,6 % (v/v)
Blau de bromofenol saturat en glicerol al 50%	12,1 % (v/v)
Bromur d'etidi (10 mg/ml)	0,2 % (v/v)
Es conserva 1 mes a 4° C.	

TE/SDS 0,1 %

Tris HCl	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	0,1 %
S'ajusta a pH 8 i s'autoclava.	

2.2.4.B.2 Preparació del gel

Per l'electroforesi de mostres d'RNA es preparen els gels en condicions desnaturalitzants (en presència de formaldehid).

SOLUCIONS:

Gel per electroforesi d'RNA:

MOPS	1 X
Formaldehid	4,75 % (v/v)
Agarosa	1 % (p/v)

El formaldehid s'afegeix quan l'agarosa ha estat dissolta en MOPS 1 X i atemperada a 50 °C.

Tampó d'electroforesi d'RNA:

MOPS 0,4 M pH 7	250 ml
Acetat sòdic 2 M	12,5 ml
EDTA 0,5 M pH 8	10 ml
MOPS	1 X
Formaldehid	6,5 % (v/v)
Autoclavar la solució	

2.2.4.C Transferència i fixació de l'RNA a membranes de niló

La transferència de l'RNA a les membranes de niló NYTRAN (Schleicher & Schuell) s'efectua per capil·laritat, utilitzant SSC 5X, a temperatura ambient, durant 12-15 hores.

Una vegada transferit l'RNA es fixa a les membranes per irradiació amb UV durant 3 minuts i/o per escalfament 2 hores a 80° C. Les membranes es conserven envoltades en *Saran Wrap* (làmines de plàstic flexible transparent) a 4 °C, fins al moment de ser utilitzades.

SOLUCIONS:

SSC 20X:

Citrat sòdic 0,3 M
NaCl 3 M

S'ajusta el pH a 7, s'autoclava i es guarda a temperatura ambient.

MUNTATGE:

1. Col·loquem una superfície plana de vidre o metacrilat a sobre d'una cubeta que contingui tampó SSC 5 X de manera que quedi sostinguda pels extrems.
2. A sobre de la superfície plana col·loquem 2 tires de paper *Whatmann* amb els extrems en contacte amb el tampó. Fem rodar una vareta de vidre per tal d'eliminar les bombolles d'aire que poguessin quedar entre la superfície i el paper, repetir aquest procés després de cada un dels passos que s'esmenten a continuació.
3. Tallem els pouets del gel d'agarosa i dipositem el gel a sobre de les tires de paper. Rodegem el gel amb parafilm per a què el tampó de transferència passi només a través del gel.
4. Col·loquem una membrana de niló de la mida del gel, prèviament humidificada amb el tampó, sobre el gel.
5. A sobre de la membrana dipositem 3 papers *Whatmann* de la mateixa mida que la membrana.
6. Per últim, col·loquem tovallons de paper fins a una alçada aproximada de 15 cm, i amb compte dipositem a sobre un pes d'1 kg aproximadament. Tapem el muntatge amb làmines de *Saran Wrap* per tal de crear una atmosfera humida.

2.2.4.D Marcatge de les sondes

L'obtenció de sondes no radioactives s'ha dut a terme mitjançant el marcatge de fragments de DNA amb digoxigenina (DIG)-dUTP (Roche). Aquest mètode es basa en la substitució d'una part dels TTP que s'utilitzen en una PCR normal per molècules de DIG-dUTP que s'incorporen al DNA que s'està amplificant. El marcatge amb DIG-dUTP permet el reconeixement de la sonda per l'anticòs antiDIG-AP (conjugat amb l'enzim fosfatasa alcalina) (Roche) que en posar-lo en contacte amb el substrat CDP-Star (Roche), dóna lloc a un producte quimioluminiscent.

2.2.4.D.1 Síntesi de la sonda

REACCIÓ DE LA PCR	
DNA motlle (pET-GK)	20-40 ng
Tampó de la Taq polimerasa	1X
Mg ₂ Cl	1-3 mM
dATP	200 µM
dGTP	200 µM
dCTP	200 µM
TTP	130 µM
DIG-dUTP	70 µM
Oligonucleòtid <i>forward</i> (GK1)	0,25 µM
Oligonucleòtid <i>reverse</i> (GK2)	0,25 µM
Taq DNA polimerasa	0,25 U

Es comprova mitjançant electroforesi en gel d'agarosa que la sonda ha estat amplificada.

2.2.4.D.2 Purificació de la sonda

Aquesta etapa és necessària per eliminar els nucleòtids no incorporats i altres components de la reacció de PCR, i evitar així que interfereixin en reaccions posteriors. La purificació de la sonda obtinguda es du a terme seguint les indicacions de l'apartat 2.2.1.C.1.

Una vegada la sonda està marcada, purificada i quantificada es pot emmagatzemar a -20 °C. Abans de ser afegida en el líquid d'hibridació, cal bullir-la durant 10 minuts i mantenir-la en gel durant 10 minuts més.

2.2.4.E Dot blot

Aquesta tècnica ens permet comprovar que la sonda s'ha marcat correctament. Es fan una sèrie de dilucions de la sonda purificada, que es dipositen en un filtre de niló per tal de realitzar una immunodetecció.

PROTOCOL:

1. Es preparen dilucions de la sonda (1/4, 1/40, 1/400, 1/4000) en TE.
2. Tallar una porció de filtre de niló Nytran (Schleicher & Schuell), i marcar seccions quadrades, on es dipositaran mostres de les dilucions de la sonda, i mullar-lo en SSC 2 X.
3. Col·locar el filtre mullat sobre paper de filtre i dipositar 1 µl de cada dilució en el centre dels quadrats.
4. Fixar el DNA durant 3 minuts a l'ultraviolat o 2 hores a 80 °C.
5. Un cop s'ha fixat el DNA a la membrana es procedeix a realitzar la immunodetecció (apartat 2.2.4.G).

2.2.4.F Prehibridació, hibridació i rentats dels filtres amb l'RNA fixat

2.2.4.F.1 Prehibridació

La prehibridació té com a funció bloquejar la membrana per impedir la unió inespecífica de la sonda.

Durant aquesta etapa posem en contacte les membranes que contenen l'RNA transferit amb el líquid d'hibridació en absència de la sonda marcada durant un mínim de 2 hores, a 50 °C. El procés s'efectua a temperatura constant en un forn proveït d'un eix rotatori.

PROTOCOL:

1. Rentar la membrana amb 15 ml de SSC 2x durant 5-10 minuts mentre la temperatura del forn d'hibridació arriba a 50 °C.
2. Incubar la membrana amb 15 ml de *High SDS buffer* a 50 °C durant 2 hores.

SOLUCIONS:

High SDS Buffer:

Formamida	15 ml
SSC 20x	7,5 ml
<i>Blocking reagent</i> (Roche)	0,6 g
Fosfat sòdic 1M	1,5 ml
N-laurylsarcosina 10 %	300 µl
SDS	2,1 g
H ₂ O mQ	qsp 30 ml

2.2.4.F.2 Hibridació i rentats

Aquest procés també es desenvolupa al forn d'hibridació, a la temperatura i períodes de temps adequats per a cada pas.

PROTOCOL:

1. Preparem la dilució de la sonda (1:3000) en funció dels resultats obtinguts en el *Dot Blot* (veure apartat 2.2.4.E).
 - 4-10 µl de sonda (prèviament bullida i refredada).
 - 15 ml de *High SDS Buffer*
2. Fer bullir la sonda amb 1 ml de *High SDS Buffer* durant 10 min. Seguidament, deixar refredar en gel 5 minuts. Aquest pas facilita la separació de les hebres de la sonda. Barregem la sonda que hem bullit amb la resta del tampó.
3. Incubar la membrana amb el líquid d'hibridació que conté la sonda durant 16 hores a 50 °C. El líquid d'hibridació s'emmagatzema a -20 °C (pot ser reutilitzat).
4. S'efectuen dos rentats consecutius amb 100 ml d'SSC 2 X i SDS 0,1 % durant 15 minuts a temperatura ambient.
5. Posteriorment, es duen a terme dos rentats d'alta astringència, que impliquen baixa concentració de sals i elevada temperatura. Aquests rentats s'efectuen amb 100 ml d'SSC 0,2 X i SDS 0,1 % durant 15 minuts a 68 °C.
6. Una vegada finalitzats els rentats es cobreix la membrana amb *Saran wrap* i es guarda a 4 °C fins dur a terme la immunodetecció.

2.2.4.G Immunodetecció, exposició i revelat

La immunodetecció té com a finalitat detectar en el filtre la sonda marcada amb DIG-dUTP que ha quedat unida específicament a l'RNA. Per a tal fi, s'utilitza l'anticòs antiDIG-AP conjugat amb fosfatasa alcalina (Roche), i un substrat d'aquesta fosfatasa, CDP-StarTM (Roche).

Els experiments de *Northern blot* han estat normalitzats mitjançant la quantificació dels RNA ribosòmics o de β-actina.

PROTOCOL:

1. Incubar la membrana durant 4 minuts amb 50 ml de tampó de rentat.
2. Col·locar la membrana 30 minuts amb 50 ml de tampó de bloqueig.
3. Seguidament s'incuba la membrana amb 9 ml de Solució d'anticòs.
4. Efectuar 2 rentats durant 15 minuts amb 50 ml de tampó de rentat.
5. Equilibrar amb 50 ml de tampó de detecció durant 5 min.
6. Es col·loca la membrana en una bossa de plàstic on s'afegeix 1 ml de la solució amb substrat ben repartida per la superfície de la membrana.
7. La membrana s'exposa a una pel·lícula Hyperfilm (Amersham) i s'introdueix en un casset amb pantalla intensificadora de senyal. El temps d'exposició varia en funció de la intensitat del senyal.
8. Les pel·lícules es revelen submergint-les en els líquids de revelat, parada i fixació durant intervals de temps que depenen de l'exposició i de la intensitat del senyal que queda impressionat en la pel·lícula per la quimioluminescència emesa per la sonda hibridada amb l'RNA.

Els passos 1-5 s'efectuen en agitació.

La quantificació dels senyals obtinguts s'ha efectuat a través de la utilització del programa *NIH Image 1.62* (National Institutes of Health, USA).

SOLUCIONS:

Tampó de rentat (0,5 l):

Àcid malèic	5,80 g
NaCl	4,38 g
Tween20	1,5 ml
H ₂ O mQqsp	500 ml
Ajustar pH 7,5	

Tampó d'àcid malèic (0,5 l):

Àcid Malèic	5,80 g
NaCl	4,38 g
H ₂ O mQ	qsp 500 ml
Ajustar pH 7,5	

Tampó de bloqueig 10x (0,5l):

<i>Blocking reagent</i> (Roche)	5 g
Tampó d'àcid malèic	qsp 500 ml

Solució d'anticòs (9 ml):

Anti-Digoxigenin-AP (Roche)	0,4 µl
<i>Blocking buffer</i> (Roche)	1 X

Tampó de detecció (0,5l):

Tris-HCl	6,06 g
NaCl	2,92 g
H ₂ O mQ qsp	500 ml
Ajustar pH 9,5	

Solució substrat *CDP-Star* (1 ml):

<i>CDP-Star</i> (Roche)	10 µl
Tampó de detecció	990 µl

2.2.4.H Sondes utilitzades

En els experiments de *Northern blot* descrits en aquesta memòria, s'ha utilitzat una sonda homòloga per a *GCK* d'*Sparus aurata*, que correspon a un fragment de 202 pb, que inclou els nucleòtids 384 a 585 de la seqüència de cDNA de *GCK* de fetge d'orada (número d'accés en el DDBJ/EMBL/GeneBank: AY206500).

2.2.5 WESTERN BLOT

La tècnica de *Western blot* permet detectar proteïnes mitjançant un anticòs específic. Aquestes proteïnes han estat sotmeses prèviament a una resolució electroforètica en gels de poliacrilamida amb SDS, i a la transferència a una membrana de niló o nitrocel·lulosa.

2.2.5.A Obtenció d'extractes crus de teixit hepàtic

Teixit hepàtic d'orada es va pulveritzar i congelar a -80 °C (obtingut tal com es descriu en l'apartat 2.1.1.A) fins al moment d'utilitzar-lo. Per pesar-ne la quantitat necessària, s'utilitzen tubs de vidre prèviament tarats i refredats en nitrogen líquid, per evitar la descongelació de la mostra fins a entrar en contacte amb la solució d'homogeneïtzació.

PROTOCOL:

1. Pesar 50-100 mg de teixit hepàtic i afegir-hi ràpidament la solució d'homogeneïtzació en una relació 1:5 p/v (mg/µl).
2. Mantenir les mostres en gel i homogeneïtzar-les durant 30 segons, utilitzant un POLYTRON-PTA 7 en posició 3; passar els homogeneïtzats a tubs eppendorf.
3. Centrifugar a 4 °C durant 30 minuts a 10000 g.
4. Recollir els sobrenedants i quantificar la proteïna total seguint el mètode descrit en l'apartat 2.2.5.B.

Solució d'homogeneïtzació

Tampó Tris HCl pH 7,5	50 mM
EDTA	4 mM
NaF	50 mM
Sacarosa	250 mM
PMSF	0,5 mM
DTT	1 mM
KCl	100 mM

Aquesta solució es prepara 10 X, sense sacarosa, PMSF i DTT, que s'afegeixen al moment de diluir la solució per fer-la servir en l'obtenció dels extractes proteics; es guarda a 4 °C. El PMSF es prepara 200 mM en n-propanol i es guarda en ampolla de color topazi, a temperatura ambient. L'addició de KCl permet establir la GCK.

2.2.5.B Quantificació de proteïnes: mètode de Bradford

La determinació de la proteïna total es realitza seguint el mètode de *Bradford* (1976). Aquest mètode es basa en la formació de complexos entre les proteïnes i el colorant *Coomassie brilliant blue G-250*. Els complexos formats absorbeixen a una longitud d'ona de 600 nm, de manera que l'absorbància a aquesta longitud d'ona serà proporcional a la concentració de proteïna de la mostra. Aquesta determinació ha estat adaptada per ser efectuada a l'autoanaltzador COBAS MIRA S.

L'assaig s'ha dut a terme a 30 °C barrejant 5 µl d'extracte en un volum final de 250 µl i utilitzant el reactiu *BioRad Protein assay* (BioRad). Els valors d' $A_{600\text{ nm}}$ s'interpolen a una corba patró obtinguda amb solucions d'albumina sèrica bovina de concentracions entre 0,125 i 1 mg/ml.

2.2.5.C Electroforesi de proteïnes

L'electroforesi de proteïnes en gel d' SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) és una tècnica utilitzada per a la separació de proteïnes en funció del seu pes molecular. Consisteix en la desnaturalització de les proteïnes de la mostra amb SDS, que confereix càrrega negativa al complex. Les proteïnes desnaturalitzades se separen en una matriu de poliactilamida en ser sotmeses a un camp elèctric. L'electroforesi es va realitzar seguint les indicacions de Laemmli i col·l (1970).

2.2.5.C.1 Preparació de les mostres

Una vegada obtinguts i quantificats els extractes proteics se'ls afegeix tampó de càrrega de proteïnes i es deixen bullir durant 5-10 minuts. L'ebullició en presència d' SDS i β-mercaptoetanol permet que les proteïnes es desnaturalitzin.

SOLUCIONS:

Tampó de càrrega de proteïnes 4 X

Tris HCl pH 6,8	0,25 M
SDS	8 %
Glicerol	40 %
β-mercaptoetanol	20 %
Blau de bromofenol	0,04 %

El glicerol dóna densitat a les mostres, mentre que el colorant blau permet visualitzar el front d'electroforesi. El tampó es prepara 4 X i es conserva al·lquotat a -20 °C.

2.2.5.C.2 Preparació de gels de poliacrilamida

Per efectuar l'SDS-PAGE s'utilitzen gels que consten de dues parts: el gel apilador i el gel separador. Aquests es diferencien per la concentració de poliacrilamida i el pH.

La part superior formada pel gel apilador conté una proporció d'acrilamida del 4 %, de manera que la mida del porus del tramat és major. La funció d'aquest gel és alinear l'entrada de les proteïnes abans de ser separades.

La part inferior està constituïda pel gel separador, amb un percentatge de poliacrilamida major (7-20 %) que genera un tamany de porus més petit, què permet la separació de les proteïnes en funció del tamany molecular. Concentracions elevades de polímer milloren la resolució de mostres de pes molecular baix, mentre que gels separadors de concentració baixa afavoreixen la transferència posterior a membranes. Aquests gels s'han preparat utilitzant vidres i cubetes OWL.

SOLUCIONS:

Gel separador (10% acrilamida, pH 8,8)

Acrilamida/bisacrilamida	3,3 ml
Tampó B	2,5 ml
SDS al 10%	100 µl
H ₂ O	4 ml
Persulfat amònic al 10%	75 µl
TEMED	7,5 µl

Gel apilador (4 % acrilamida, pH 6,8)

Acrilamida/bisacrilamida	1,3 ml
Tampó A	2,5 ml
SDS al 10%	100µl
H ₂ O	6 ml
Persulfat amònic al 10%	75 µl
TEMED	6 µl

El persulfat amònic actua com a polimeritzador de l'acrilamida/bisacrilamida, mentre que el TEMED catalitza la polimerització; no s'han d'afegir, per tant, fins al moment final de la preparació de cadascuna de les solucions que componen les diferents parts del gel. Les solucions de persulfat amònic al 10 %, d'SDS al 10 % i de TEMED es guarden aliquotades a -20 °C, a temperatura ambient i a 4 °C, respectivament.

Tampó A:

Tris HCl 0,5 M pH 6,8

Acrilamida/bisacrilamida:

30% acrilamida/Bis solution, 37,5:1 (2,6 %C)
(BioRad)

Tampó B:

Tris HCl 1,5 M pH 8,8

2.2.5.C.3 Procés electroforètic

Per identificar els pesos moleculars de les proteïnes de les mostres en estudi, es carreguen en un carril marcadors pretenyits de pes molecular conegut, *Kaleidoscope Prestained Standards* (BioRad). Les mostres, amb igual quantitat de proteïna, es carreguen al gel per desenvolupar l'electroforesi a temperatura ambient. En cas d'utilitzar gels de 0,75 mm de gruix, el procés electroforètic té lloc a 15 mA durant la migració de les proteïnes pel gel apilador i a 20 mA quan entren en el separador. Si el gel és de 1,5 mm de gruix, o bé quan es fan córrer 2 gels simultàniament, la intensitat s'augmenta a 30 i 40 mA, respectivament. Es tracta d'un procés de durada variable, en funció de la concentració del gel separador i de la mida de les proteïnes a estudiar. De manera general, el procés acaba quan el front del colorant blau arriba a la part inferior del gel. És important precórrer el gel durant 15 minuts abans de carregar les mostres. Una vegada finalitzada l'electroforesi, es procedeix a la transferència o bé a la tinció per normalitzar les proteïnes.

SOLUCIONS:

Tampó d'electroforesi

Tris HCl pH 8,3	0,025 M
Glicina	0,192 M
SDS	0,1 %

Es prepara 10 X i es conserva a temperatura ambient.

2.2.5.D Transferència de proteïnes a membrana

Les proteïnes són transferides a una membrana de niló (*NYTRAN 0,45 µm*; Schleicher & Schuell) per electroelució a 60 V durant 2-3 hores, en tampó de transferència.

PROTOCOL:

1. Es descarta el gel apilador. El gel separador es diposita sobre un rectangle de paper *Gel blotting paper* (Schleicher & Schuell), humidificat amb tampó de transferència de proteïnes, situat sobre una espongeta que està col·locada sobre la tapa negra del casset de transferència (BioRad).
2. Sobre el gel es col·loca la membrana de niló prèviament humidificada on es volen transferir les proteïnes, sobre aquest es diposita un segon rectangle de paper i l'altra espongeta. És important fer rodolar un tub per sobre de la membrana per tal d'eliminar les bombolles d'aire (repetir aquest procés en cada pas).
3. Tancar el casset i introduir-lo en la cubeta de transferència (BioRad). Aplicar un voltatge de 60 V. Aquest procés té lloc a 4 °C, col·locant la cubeta de transferència dintre d'un bany amb gel. Mantenir el tampó de transferència en agitació mitjançant una vareta magnètica.
4. Un cop efectuada la transferència, la membrana es guarda a 4 °C en solució *blotto* per bloquejar tots els possibles llocs d'unió inespecífics de l'anticòs primari. Aquest tractament pot durar de 12 hores fins a 1 setmana, a condició d'anar renovant la solució *blotto*; el bloqueig aconsegueix reduir el soroll de fons durant la immunodetecció. Per altra banda, al finalitzar la transferència és convenient dur a terme la tinció del gel amb blau de *Coomassie* per comprovar que el procés de transferència de proteïnes ha estat efectiu.

SOLUCIONS:

Solució *blotto*

Llet descremada en pols	10 %
PBS	1 X

S'ha utilitzat llet desnatada comercial Central Lechera Asturiana.

PBS es prepara com es descriu a l' apartat 2.1.3.B.

Tampó de transferència de proteïnes

Tris HCl	0,025 M
Glicina	0,192 mM
Metanol	20 %

Es prepara en el moment de transferir, diluint un estoc 10 X amb H₂O destil·lada freda.

2.2.5.E Tinció de proteïnes amb blau de *Coomassie*

El procediment de tinció es basa en la fixació del colorant blau de *Coomassie* a les proteïnes. Consisteix en incubar el gel d'electroforesi de proteïnes, amb la solució de tinció i després, per eliminar el soroll de fons, amb la solució de rentat.

PROTOCOL:

1. Incubar el gel en solució de tinció, durant un mínim de 90 minuts.
2. Efectuar rentats successius del gel amb solució de rentat, fins que s'elimini la coloració inespecífica.
Una vegada tenyits i rentats, els gels d'acrilamida poden assecar-se en un assecador de gels connectat a una bomba de buit. Abans d'assecar-los, els gels s'han de col·locar entre dues làmines de paper de cel·lofana remullat en solució de rentat. La dessecació s'efectua a 60-80 °C, durant 1 hora per gels primis i durant 2 hores en el cas de gels gruixuts.

SOLUCIONS:

<u>Solució de tinció</u>		<u>Solució de rentat</u>	
Metanol	40 %	Metanol	40 %
Àcid acètic glacial	7 %	Àcid acètic glacial	7 %
Blau de <i>Coomassie</i>	0,025 %		

2.2.5.F Immunodetecció

Per efectuar la immunodetecció, hem seguit les pautes descrites pel proveïdor de l'*ECL Western blotting system* (Amersham). La tècnica es basa en una incubació successiva de la membrana amb dos anticossos. El primer anticòs permet reconèixer la proteïna en estudi de manera més o menys específica.

L'anticòs secundari és una anti-IgG, que reconeix l'anticòs primari i porta associada l'activitat enzimàtica peroxidasa de rave. Aquest enzim catalitza l'oxidació del luminol en medi alcalí, a través d'una reacció que emet una luminescència que pot ser captada en una pel·lícula fotogràfica. Així doncs, els senyals en la pel·lícula indiquen la presència de la proteïna en la membrana.

PROTOCOL:

1. Incubar la membrana amb una dilució adequada de l'anticòs primari col·locada en una bossa de plàstic segellada durant tota la nit a 4 °C en un agitador orbital. Alternativament, es pot dur a terme la incubació durant 60 minuts a temperatura ambient.
2. Retirar l'anticòs primari (conservar la solució a -20 °C per reutilitzar-la en experiments posteriors) i efectuar 3 rentats de la membrana, durant 10-15 minuts, amb 100 ml de solució de rentat.
3. Incubar la membrana amb l'anticòs secundari a una dilució de 1/5000 durant 60 minuts en agitació suau i a temperatura ambient.
4. Retirar l'anticòs secundari i efectuar els 3 rentats tal com es descriu en el punt 2.
5. Procedir a la immunodetecció, seguint el protocol *ECL Western blotting* (Amersham).

SOLUCIONS:

<u>Solució per diluir els anticossos</u>		<u>Solució de rentat</u>	
Llet descremada en pols	5 %	PBS	1 X
PBS	1 X	Tween 20 (Sigma)	0,1 %
Tween 20 (Sigma)	0,1 %		

2.2.6 ASSAIG DE RETARDACIÓ EN GEL (UNIÓ DNA-PROTEÏNA)

Consisteix en la incubació de proteïnes (procedents d'extractes nuclears, apartat 2.2.6.A, o bé sintetitzades mitjançant transcripció/traducció *in vitro*, apartat 2.2.3) amb un fragment de DNA marcat, en aquest cas amb dideoxinucleòtids units a DIG (DIG-ddUTP) en l'extrem 3'. La unió de proteïna-DNA genera un complex que tindrà una mobilitat retardada en relació al fragment de DNA lliure al sotmetre les mostres a electroforesi en gel de poliacrilamida.

2.2.6.A Obtenció d'extractes nuclears a partir de cèl·lules en cultiu

Per a aquesta finalitat es va seguir el protocol descrit per Andrews i Faller (1991).

PROTOCOL:

1. Les cèl·lules són desenganxades de la placa i es recullen en 1,5 ml de PBS 1 X fred.
2. Es realitza una centrifugació de 10 segons per obtenir les cèl·lules sedimentades.
3. Seguidament es resuspenen en 400 µl de tampó A fred (*Hypotonic Buffer*).
4. S'incuben en gel durant 10 minuts.
5. Transcorregut aquest temps es mesclen durant 10 segons, i se centrifuguen 10 segons més.
6. El sediment, que conté els nuclis, es resuspèn en 40 µl de tampó C fred (*High Salt Buffer*) i s'incuba 20 minuts en gel.
7. Per tal de separar els residus cel·lulars de les proteïnes nuclears (sobrenedant) se centrifuga a 4 °C durant 2 minuts a 13000 g.
8. Una vegada quantificades les proteïnes del sobrenedant, s'afegeixen inhibidors de proteases, es fan alíquotes i s'emmagatzemen a -70 °C.

SOLUCIONS:

Tampó A (*Hypotonic buffer*)

Hepes-KOH pH 7,9	10 mM
Mg Cl ₂	1,5 mM
KCl	10 mM
NaNO ₃	2 mM
NaF	2 mM

Tampó C (*High Salt Buffer*)

Hepes-KOH pH 7,9	20 mM
Glicerol	25 %
NaCl	420 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	0,2 mM

Abans de ser utilitzats cal afegir DTT 0,5mM i PMSF 0,5 mM als tampons A i C.

2.2.6.B Preparació d'oligonucleòtids marcats

S'utilitzen fragments de DNA de doble cadena d'una llargada d'uns 20 nucleòtids i 3' protuberants, que són marcats a l'extrem 3' amb una molècula de DIG-ddUTP mitjançant l'acció d'una transferasa terminal.

2.2.6.B.1 Obtenció d'oligonucleòtids de doble cadena

Oligonucleòtids utilitzats: Sp1-cons, GK-56/-37, GK-56/-37mutSp, SREBP-cons, GK-111/-93, GK-111/-93mutSRE. Els oligonucleòtids utilitzats en els assajos de retardació en gel corresponents a la PFKFB1 són els descrits per Metón i col·l (2006).

PROTOCOL:

1. Per tal de generar DNA de doble cadena, es fan bullir durant 5 minuts, en presència del tampó M (Roche), quantitats iguals dels oligonucleòtids sentit i antisentit que es volen marcar. Aquests oligonucleòtids es dissenyen amb un nucleòtid extra a l'extrem 3', de manera que la molècula de doble cadena del DNA que es formi presenti extrems 3' protuberants, la qual cosa afavoreix l'activitat de la transferasa terminal.
2. Es deixen refredar lentament fins arribar a temperatura ambient.
3. Seguidament es calcula la concentració en pmol/ μ l, segons la següent fórmula:

$$\frac{2 \times 10^6 \times \mu\text{g}/\mu\text{l (dsDNA)}}{\text{Npb} \times 660 \text{ Da}}$$

2.2.6.B.2 Marcatge de fragments de DNA amb DIG-ddUTP

PROTOCOL:

1. Incubar la reacció a 37 °C durant 30 minuts.

REACCIÓ	
dsDNA 3' protuberant	100 pmol
Tampó TdT (Roche)	4 μ l
CoCl ₂ 25 mM	4 μ l
DIG ddUTP (1mM) (Roche)	1 μ l
TdT (Roche)	1 μ l
H ₂ O mQ	qsp 20 μ l

2. Aturar la reacció amb 2 μ l d'EDTA 0,2 M.
3. Fer alíquotes de 2 μ l i guardar a -20 °C.
4. Fer *Dot Blot* per comprovar el marcatge (apartat 2.2.4.E).

2.2.6.C Electroforesi

2.2.6.C.1 Preparació de gels de poliacrilamida

S'utilitzen gels de poliacrilamida en condicions no desnaturalitzants per separar els possibles complexos de sonda-proteïna que es puguin haver format. El percentatge de poliacrilamida del gel depèn de la mida de la sonda i de la migració dels complexos a analitzar.

S'han utilitzat gels de poliacrilamida al 6 %, en condicions no desnaturalitzants.

SOLUCIONS:

Gel poliacrilamida (6 %):

TBE 10X	1,8 ml
Acrilamida/bisacrilamida	3,6 ml
Persulfat amònic 10%	75 µl
TEMED	15 µl
H ₂ O mQ	qsp 18 ml

TBE 10X:

Tris	890 mM
Àc boric	890 mM
EDTA	0,5 M
H ₂ O	qsp 1 L
Ajustar a pH 8.	
Autoclavar	

Acrilamida/bisacrilamida:

30% *acrilamida/Bis solution*, 37,5:1 (2.6%C) (BioRad)

2.2.6.C.2 Reacció d'unió proteïna-DNA marcat

Com a control s'utilitza la sonda sense extracte proteic, per tal de tenir una referència de mobilitat de la sonda lliure.

PROTOCOL:

1. Es mesclen els components de la reacció:

REACCIÓ

Extractes nuclears d'HepG2	2 µl
Oligonucleòtid marcat	1 µl
Poly [d(I-C)]	1 µg
Tampó d'unió	1 X
H ₂ O mQ	qsp 20 µl

2. La mescla de reacció s'incuba durant 1h a 4 °C.

SOLUCIONS:

Tampó d'unió:

Hepes, pH 7,6	100 mM
EDTA	5 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 mM
DTT	5 mM
Tween 20	1 % (w/v)
KCl	150 mM

Poli dI-dC (Roche): es prepara la solució *stock* dissolent el contingut del vial en 1 ml d'aigua mQ estèril, concentració final: 1 mg/ml. Es guarda aliquotat a -20 °C.

2.2.6.C.3 Assaig electroforètic

Per dur a terme l'electroforesi s'afegeix 5 µl de *loading buffer* a les mostres. El complex DNA-proteïna s'analitza en un gel de poliacrilamida al 6 % utilitzant TBE 0,5 X com a tampó d'electroforesi. L'electroforesi s'efectua a 4° C a una intensitat de 20 mA, durant 1 hora aproximadament. És important precórrer el gel abans de carregar les mostres.

SOLUCIONS:

Loading Buffer:

Blau de bromofenol	0,04 %
TBE	0,25 X
Glicerol	40 %

2.2.6.D Transferència i fixació a la membrana

Finalitzat el procés d'electroforesi el DNA és transferit per contacte (com a mínim 1 hora a temperatura ambient) a una membrana de niló Nytran (Schleicher & Schuell).

PROTOCOL:

1. Es retira un dels vidres que contenen el gel. Es col·loca l'altre vidre amb el gel a sobre, al damunt d'una superfície plana.
2. Es retalla una membrana de niló (Schleicher & Schuell) i es diposita sobre el gel.
3. A continuació es col·loquen 3 papers *Gel blotting paper* (Schleicher & Schuell), i l'altre vidre.
4. A sobre del muntatge es col·loca un pes d'1 kg aproximadament.
5. Es realitza el contacte durant 1 hora a temperatura ambient.
6. El DNA transferit es fixa a les membranes escalfant a 80 °C a un forn durant 2 hores o per entrecruament, irradiant les membranes 3 minuts a l'UV.

2.2.6.E Immunodetecció

Es realitza tal com es descriu en l'apartat 2.2.4.G.

2.2.6.F Experiments de competició

Els assajos de competició ens indiquen l'especificitat de la interacció entre l'oligonucleòtid marcat i la proteïna. Es realitzen per detectar la interacció entre el DNA (fragment del promotor marcat) i el factor de transcripció en estudi. En aquests estudis els extractes nuclears van ser preincubats durant 30 minuts amb un excés de concentració molar de la sonda control no marcada, seguidament s'afegeix l'oligonucleòtid marcat, i s'incuba 30 minuts més a 4 °C.

2.2.6.G Experiments de súper retardació

En aquests assajos la proteïna és reconeguda per un anticòs. De manera que es forma un nou complex (anticòs-proteïna-oligonucleòtid) que apareix més retardat en el gel d'electroforesi, o bé la unió de proteïna-oligonucleòtid queda bloquejada. Es realitzen per verificar la unió del factor de transcripció específic al fragment del promotor. S'afegeixen a la mescla de reacció 1-2 µg de l'anticòs abans d'introduir el oligonucleòtid marcat, i s'incuba a temperatura ambient durant 30 minuts. Posteriorment s'afegeix l'oligonucleòtid marcat i es prossegueix amb la incubació de la reacció durant 45 minuts més a 4 °C.

2.2.7 IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA (CHIP)

El ChIP és una tècnica que s'utilitza per estudiar les interaccions DNA-proteïna *in vivo*. Permet detectar la presència de proteïnes unides al DNA. Es basa en la fixació de la cromatina cel·lular amb formaldehid, per establir enllaços covalents entre les proteïnes i les seqüències de DNA adjacents. A continuació les cèl·lules es lisen i la cromatina és fragmentada per sonicació. El complex DNA-proteïna és immunoprecipitat amb un anticòs específic que s'uneix a les proteïnes unides a DNA. Posteriorment, les proteïnes són eliminades per tractament amb proteïnasa K i es purifica el DNA. Els fragments de cromatina immunoprecipitats seran analitzats per PCR amb oligonucleòtids específics.

2.2.7.A Aïllament de la cromatina i entrecreuament

PROTOCOL:

1. La manipulació de les orades i la presa de mostres es va efectuar tal com es detalla a l'apartat 2.1.1.A.
2. Pesar els teixits hepàtics i transferir-los a un tub Falcon que conté DMEM d'alt contingut en glucosa i en absència de sèrum. Seguidament, trossejar el teixit.
3. Addicionar formaldehid a concentració final de l'1 %. Fixar les cèl·lules durant 15 minuts a temperatura ambient. L'entrecreuament uneix, mitjançant enllaços carbamida, el DNA amb factors nuclears, proteïnes reguladores i remodeladors de la cromatina.
4. Aturar l'entrecreuament per addició de glicina a pH 8 i concentració final de 0,125 M, deixar en agitació per rotació durant 5 minuts.
5. Centrifugar les mostres a 100 g durant 1 minut i rentar el precipitat amb PBS 1 X fred. Resuspendre'l finalment en PBS 1 X. Les etapes posteriors s'efectuen a 4 °C.
6. Disgregar el teixit en un homogeneitzador tipus *Dounce*.
7. Centrifugar les mostres durant 1 minut a 100 g i resuspendre el sediment en 1 ml de tampó de lisi cel·lular. Incubar les mostres en gel durant 12 minuts.
8. Centrifugar les mostres 5 minuts a 1900 g a 4° C i resuspendre el precipitat en 1 ml de tampó de lisi nuclear, deixar de nou en gel durant 12 minuts. Transferir la solució a un Falcon.
9. Afegir 0,2 g de boletes de vidre (Sigma) i sonicar els nuclis lisats, per tal d'obtenir els fragments de cromatina. Sonicar la cromatina a 0,3 cicles i 100 % d'amplitud durant 30 segons. Entre cicles mantenir la mostra en gel durant 2 minuts. Repetir el procediment 4 vegades.
10. Transferir el contingut a tubs eppendorfs i centrifugar 10 minuts a 15000 g a 4 °C, a fi d'eliminar els restes cel·lulars.
11. Repartir el sobrenedant obtingut, corresponent a la cromatina soluble, en alíquotes de 200 µl i congelar amb nitrogen líquid. Emmagatzemar a -20 °C.

2.2.7.B Preparació del control amb càrrega de DNA total (unit més no unit; input)

PROTOCOL

1. Addicionar 400 µl de tampó de lisi nuclear a 50 µl de cromatina, mesclar. Incubar a 65 °C en agitació mitjançant rotació durant 16 hores.
2. Afegir 5 µl de proteïnasa K (40 mg/ml) i incubar durant 2 hores a 37 °C.
3. Purificar mitjançant el mètode de fenol/cloroform, descrit a l'apartat 2.2.7.D.2.

2.2.7.C Immunoprecipitació

El complex format entre DNA-proteïna-anticòs és immunoprecipitat mitjançant proteïna A *sepharose* bloquejada prèviament amb BSA i esperma de salmó per tal d'evitar interaccions inespecífiques.

PROTOCOL:

1. Bullir 12,5 µl d'esperma de salmó (5 mg/ml), prèviament sonicat i purificat, durant 5 minuts.
2. Seguidament incubar en gel durant 3 minuts, i fer un pols de centrífuga.
3. Rentar 40 µl de proteïnes A/G (0,5 ml agarosa/ 2 ml) ben resuspeses dues vegades amb PBS 1 X (centrifugant a 5900 g durant 1 minut).
4. Rentar amb 40 µl de tampó de lisi nuclear (5900 g durant 1 minut) i resuspendre el sediment amb 40 µl del mateix tampó.
5. Dividir les proteïnes tractades en dos tubs diferents, i afegir 6,25 µl d'esperma de salmó.
6. Afegir 100 µl de cromatina a cada tub i deixar (tapat amb parafilm) 30 minuts a 4 °C en rotació.
7. Centrifugar durant 1 minut a 5900 g, transferir el sobrenedant a un tub eppendorf. Si cal, afegir tampó de lisi fins arribar a 100 µl.
8. Afegir 8 µg d'anticòs. Cobrir el tub amb parafilm i incubar 16 hores en agitació per rotació a 4 °C.
9. Afegir 20 µl de proteïnes A/G amb o sense esperma de salmó sonicat (preparat segons l'apartat 2.2.7.D), mesclar i incubar durant 2 hores en rotació.
10. Centrifugar les mostres durant 1 minut a 5900 g i descartar el sobrenedant.
11. Efectuar 3 rentats d'1 minut centrifugant a 5900 g amb tampó de rentat 1.
12. Rentar amb tampó de rentat 2 centrifugant a 5900 g durant 1 minut.
13. Eluir el complex DNA-anticòs addicionant 450 µl de tampó d'elució, i sotmetre a rotació durant 15 minuts a temperatura ambient. Recuperar l'eluit.
14. Afegir 5 µl de proteïnasa K (40 mg/ml H₂O) i incubar durant 2 hores a 37 °C.
15. Desfer l'entrecruament incubant a 65 °C durant 16 hores.
16. Purificar el DNA mitjançant el mètode de fenol-cloroform, resuspendre el precipitat purificat en 20 µl de TE a pH 8 estèril.

Com a control de la immunoprecipitació es processa una alíquota en paral·lel en absència d'anticòs.

REACTIUS:

Tampó de lisi cel·lular

PIPES pH 8,0	5 mM
KCl	85 mM
NP40	0,5 %

Tampó de rentat 1

SDS	0,1 %
Tritó X-100	1 %
EDTA	2 mM
Na Cl	150 mM
Tris-HCl pH 8,0	20 mM

Tampó d'elució

NaHCO ₃	12,6 mg
SDS 10 %	150 ml
H ₂ O mQ	qsp 1,5 ml

Tampó de lisi nuclear

SDS	1 %
EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 8,0	150 mM

Tampó de rentat 2

SDS	0,1 %
Tritó X-100	1 %
EDTA	2 mM
NaCl	500 mM
Tris-HCl pH 8,0	20 mM

2.2.7.D Preparació d'esperma de salmó

PROTOCOL:

2.2.7.D.1 Fragmentació del DNA

1. Dissoldre 250 mg d'esperma de salmó (Sigma) en 50 ml d'aigua mQ agitant per rotació a temperatura ambient durant 10 hores (concentració final: 5 mg/ml).
2. Deixar a 4 °C durant 16 hores.
3. Fer alíquotes de 750 µl i congelar a -20 °C.
4. Sonicar 750 µl d'esperma de salmó 5 vegades, 0,3 cicles a 100% d'amplitud amb incubacions de 2 minuts en gel entre cada procés de sonicació.

2.2.7.D.2 Purificació de l'esperma de salmó

1. Addicionar 1 volum de fenol a un eppendorf que conté 750 µl d'esperma de salmó sonicat. Mesclar amb el vòrtex.
 2. Centrifugar 1 minut a 5900 g. Traspasar el sobrenedant a un tub eppendorf.
 3. Afegir 1 volum de cloroform-alcohol isoamílic, i mesclar.
 4. Centrifugar durant 1 minut a 5900 g. Traspasar el sobrenedant a un tub eppendorf.
- Realitzar aquesta etapa en la campana de flux laminar ja que els reactius utilitzats són tòxics.

2.2.7.D.3 Precipitació del DNA

1. Afegir 0,1 volum d'acetat sòdic 3 M pH 5,5 i 2 volums d'etanol absolut. Mesclar i incubar durant 30 minuts a -80 °C.
2. Centrifugar 15 minuts a 15000 g.
3. Rentar amb etanol al 70 % durant 1 minut a 15000 g per tal d'eliminar les restes de sals del precipitat. Secar el DNA durant 10 minuts.
4. Resuspendre el precipitat en 100 µl de TE a pH 8 estèril.

2.2.7.E Anàlisi del DNA immunoprecipitat

Per tal de determinar si la fracció de cromatina immunoprecipitada amb els diferents anticossos conté el fragment del promotor en estudi, les mostres de DNA se sotmeten a una reacció de PCR utilitzant oligonucleòtids específics. S'han utilitzat els oligonucleòtids ME0004 i ME0202, que amplifiquen una regió d'aproximadament 200 pb (de -72 a +78) del promotor de *GCK* hepàtica d'orada (número d'accés en el DDBJ/EMBL/GeneBank: AY206500).

CONDICIONS D'AMPLIFICACIÓ:

1. 94 °C 2 minuts
2. 94 °C 30 segons
3. 62 °C 30 segons
4. 72 °C 50 segons
5. 24 cicles a partir del segon pas

2.2.8 CULTIUS DE LÍNIES CEL·LULARS EUCARIOTES I TRANSFECCIONS

2.2.8.A Condicions i tècniques generals

El manteniment de cultius cel·lulars es realitza en condicions estèrils. Es treballa en campana de flux laminar. La sala de treball i la campana s'irradien amb llum ultraviolada quan no són utilitzades. La superfície de la campana de flux laminar es descontamina amb etanol al 70 % i amb altres productes adequats (Virkon, Bayer) a l'inici i final del seu ús. Tot el material emprat és prèviament esterilitzat a l'autoclau. Els medis i solucions es compren estèrils o bé s'esterilitzen mitjançant filtres de 0,22 µm o amb l'autoclau.

2.2.8.A.1 Arrancada del cultiu cel·lular

Les cèl·lules es mantenen congelades a -80 °C per a períodes curts (mesos) i per a períodes llargs (anys) es mantenen congelades en criotubs en nitrogen líquid.

PROTOCOL:

1. Descongelar les cèl·lules ràpidament a 37 °C (en cas de cèl·lules de peix descongelar-les a temperatura ambient).
2. Traspasar el contingut del vial a un tub Falcon amb 7 ml del medi complet, adequat per a cada tipus cel·lular, a 4 °C.
3. Centrifugar a 2000 g durant 5 minuts.
4. Eliminar el sobrenedant.
5. Resuspendre el sediment en un volum adequat de medi complet (10 ml per un flascó de 75 cm²).
6. Introduir la barreja a un flascó o placa, agitar-ho suaument, per tal que les cèl·lules quedin ben repartides, i col·locar el flascó a l'incubador.
7. Canviar el medi a les cèl·lules i tripsinitzar-les abans que arribin a confluència.

2.2.8.A.2 Manteniment dels cultius cel·lulars: tripsinització

La confluència de cèl·lules en cultiu podria causar canvis en les característiques bioquímiques i funcionals de les cèl·lules. La tripsinització ens permet separar les cèl·lules de la superfície de la placa on es troben adherides, per diluir-les periòdicament.

Per a la tripsinització, el cultiu cel·lular s'incuba amb tripsina-EDTA 1X (Sigma) durant un curt interval de temps (de 2 a 20 minuts aproximadament); això debilita les unions entre les cèl·lules i la placa, sense que la integritat de les cèl·lules es vegi amenaçada. Podem facilitar el deslligament definitiu de les cèl·lules donant petits cops al flascó. Finalment es recullen les cèl·lules afegint medi complet, i seguidament s'efectuen les dilucions corresponents.

PROTOCOL:

1. Aspirar el medi de la placa de 75 cm².
2. Rentar les cèl·lules amb 5 ml de PBS 1 X. Aspirar el PBS 1 X.
3. Afegir 1 ml de tripsina i agitar suaument el flascó per tal que la tripsina es reparteixi per tota la superfície.
4. Esperar el temps necessari per a què les cèl·lules es desenganxin de la superfície. Durant aquest temps colpejar el flascó per tal de facilitar el procés. A simple vista o bé al microscopi, es pot observar la suspensió de cèl·lules que llisquen.
5. Una vegada les cèl·lules llisquen, afegim 9 ml de medi complet per tal d'inhibir l'acció de la tripsina i recollir les cèl·lules.
6. Es realitza la dilució desitjada repartint les cèl·lules en suspensió en diferents flascons i afegint la quantitat necessària de medi complet.

L'etapa de rentat amb PBS 1X és imprescindible per eliminar les restes de medi amb sèrum que inhibirien l'acció de la tripsina. La freqüència de tripsinització depèn de la velocitat de creixement de la línia cel·lular i de la dilució inicial de la placa.

2.2.8.A.3 Congelació de cèl·lules

PROTOCOL:

1. Tripsinització de les cèl·lules.
2. Es recullen les cèl·lules en un Falcon amb 10 ml de medi complet.
3. Se centrifuguen les cèl·lules a 2200 g a 4 °C.
4. Es ressuspenen les cèl·lules sedimentades amb 1 ml de medi complet, amb 20 % de sèrum fetal boví, i 10 % de DMSO (crioprotector), i s'aliqüoten en criotubs.
5. Es procedeix a la congelació progressiva de les mostres: es congelen les cèl·lules a -20 °C, passades 2-4 hores es passen a -40 °C, i l'endemà es guarden a -80 °C o en N₂ líquid.

2.2.8.B Transfecció transitòria de cèl·lules

La transfecció és una tècnica que permet introduir DNA exogen en cèl·lules eucariotes. En el cas de què les cèl·lules se sotmetin a un tractament que permeti la integració del DNA en el genoma cel·lular, es tractaria d'una transfecció estable. D'altra banda, en el cas de transfeccions transitòries el DNA exogen no s'integra en el genoma, de manera que no es replica conjuntament amb la cèl·lula ni es transmet a les cèl·lules filles.

Existeixen diversos protocols per efectuar una transfecció transitòria (Sambrook i col·l, 1989), generalment basats en una alteració transitòria de la permeabilitat de la membrana cel·lular. Entre aquests mètodes podem destacar: la transfecció per fosfat càlcic, la transfecció per DEAE-dextrà/cloroquina, l'electroporació i la transfecció facilitada per complexos lipídics. L'elecció d'un mètode o un altre dependrà del tipus cel·lular a transfectar.

2.2.8.B.1 Transfecció mitjançant el mètode del fosfat càlcic

Aquest mètode es basa en la coprecipitació del DNA exogen i el fosfat càlcic, per facilitar la penetració del DNA dins la cèl·lula (Graham i Van der EB, 1973). La maquinària de transcripció endògena permetrà l'expressió dels gens introduïts.

Una vegada disposem de les cèl·lules en quantitat adequada (45-50 % de confluència en plaques de 6 pous) procedirem a la transfecció.

PROTOCOL:

1. Preparar la mescla de DNA a transfectar.

Mescla per cada 2 pous de 3 cm de diàmetre	
Constructe d'interès	8 µg
pCMV β (control de la transfecció)	1 µg
Plasmidi que codifica pel factor de transcripció d'interès, o bé pel receptor de la insulina	0,8 µg
DNA portador (per igualar la quantitat de DNA)	
H ₂ O mQ	qsp 180 µl

Com a DNA portador hem utilitzat qualsevol plasmidi d'expressió no eucariota.

2. Afegir a la mescla 20 µl de CaCl₂ 2,5 M i mesclar amb el vòrtex.
3. Afegir gota a gota 200 µl de BBS 2 X a l'interior d'un tub eppendorf que conté la mescla de DNA i CaCl₂, al mateix temps que es mescla.
4. Abans d'introduir la barreja als pous comprovar al microscopi de contrast de fases, amb una gota de cada una de les mescles, la formació de precipitats (temps màxim de 20 minuts).
5. Transfectar afegint 200 µl a cada pouet.
6. Tres o quatre hores després de la transfecció es du a terme un xoc durant 2 minuts amb solució de medi sense sèrum al 10 % amb DMSO. Afegir de nou el medi complet.
7. Incubar durant 16-24 hores les cèl·lules transfectades per permetre l'expressió dels plasmidis transfectats.
8. Recollir les cèl·lules.

SOLUCIONS:

BBS 2X

BES pH 7	100 mM
NaCl	5 M
Na ₂ HPO ₄	0,5 M
H ₂ O mQ	q.s.p 50 ml

Esterilitzar filtrant, corregir el pH si és necessari i després tornar a filtrar.

El pH adequat per afavorir la formació de precipitat és aproximadament 7. És important realitzar proves de transfecció amb BBS 2 X ajustat a diferents pH, en un rang entre 6,8 i 7,2. El pH del BBS és un paràmetre crític per produir un bon precipitat.

2.2.8.B.2 Transfecció facilitada per embolcalls lipídics

Com a mètode alternatiu per a aquelles cèl·lules que no presentaven una transfecció satisfactòria amb el mètode del fosfat càlcic hem utilitzat el reactiu *FuGENE 6* (Roche). El *FuGENE 6* és un reactiu format per un conjunt de lípids no liposomals que embolcallen el DNA i el transporten a l'interior cel·lular.

PROTOCOL:

Una vegada disposem de les cèl·lules en quantitat adequada (60-70 %) procedirem a la transfecció. Aquest mètode és d'elevada eficàcia i, per tant, permet reduir el número de cèl·lules inicials en la transfecció.

1. Mesclar el reactiu *FuGENE 6* amb el medi de cultiu adequat per a les cèl·lules a transfectar però en absència de sèrum. S'utilitzen 100 µl de medi per a cada pou (plaques de 6 pous) a transfectar amb un volum de *FuGENE 6* de 2 a 6 µl, segons el tipus de cèl·lules a transfectar. És important dipositar en el tub eppendorf primer el medi i seguidament el *FuGENE 6* evitant que toqui les parets.
2. Deixar incubant durant 5 minuts a temperatura ambient.
3. Preparar la barreja de DNA que es desitja transfectar (contindrà el constructe reporter en estudi, el pCMVβ, el plasmidi que codifica per al factor de transcripció d'interès, i el DNA portador, en cas que sigui necessari). La quantitat de DNA dependrà de les cèl·lules a transfectar. S'ha utilitzat una relació *FuGENE 6*:DNA de 3,5:2 per a la transfecció de cèl·lules CHO, i de 6:2 per a les cèl·lules D11.
4. Addicionar la barreja de DNA preparada al tub que conté el *FuGENE 6* amb el medi i incubar 20 minuts a temperatura ambient, temps necessari perquè es formin els complexos.
5. Afegir la mescla sobre les cèl·lules en cultiu.
6. Passades 48 hores d'incubació recollir les cèl·lules.

2.2.8.B.3 Anàlisi de l'activitat transcripcional

- **Recol·lecció de cèl·lules:**

Per obtenir els extractes cel·lulars a partir de cèl·lules transfectades s'utilitza el reactiu de lisi *Cell Culture Lysis Reagent –CCLR* (Promega).

PROTOCOL:

1. Aspirar al buit el medi de les plaques que contenen les cèl·lules transfectades.
2. Rentar cada pouet amb 1 ml de PBS 1 X.
3. Aspirar el PBS i afegir 300 µl del reactiu CCLR per pou.
4. Deixar actuar el CCLR fins que s'observi que el lisat es desprèn agitant suaument.
5. Transferir el lisat a tubs eppendorf i centrifugar 15 segons a temperatura ambient.
6. Transferir el sobrenedant a un nou tub eppendorf.

- **Assaig de l'activitat β-galactosidasa**

Les transfeccions s'han dut a terme incloent en les barreges de transfecció 1 µg d'un plasmidi que codifica per al gen de la β-galactosidasa sota el control del promotor del citomegalovirus. Els resultats obtinguts en els assajos de β-galactosidasa han estat utilitzats per normalitzar les eficiències de transfecció (Sambrook i col·l, 1989).

PROTOCOL:

1. Preparació del lisat cel·lular (tal com es descriu en l'apartat anterior).

2. Assaig β -galactosidasa.

Es mesclen 50 μ l de lisat cel·lular obtingut amb 100 μ l de mescla de reactius per determinar l'activitat β -galactosidasa.

Mescla de reactius (100 μ l):

Mescla per cada 2 pous de 3 cm de diàmetre	
MgCl ₂ 2 M	0,075 μ l
ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosid)	33 μ l
β Mercaptoetanol-H ₂ O (1:2)	1,425 μ l
Tampó fosfat 0,1 M pH 7,5	65,5 μ l

3. S'incuba a 37 °C fins que la barreja adquireix una coloració groga (degut a que la β -galactosidasa trenca el substrat ONPG en dos compostos, un dels quals és de color groc).

4. Aturar la reacció afegint-hi 250 μ l de Na₂CO₃ 0,5 M.

5. Llegir la OD_{420nm} a l'espectrofotòmetre.

SOLUCIONS:

ONPG (AppliChem):

Es prepara una solució de 4 mg/ml d'ONPG en tampó 0,1 M Na₂PO₄ pH 7,5. Es dissol amb l'ajuda d'un agitador magnètic en un recipient protegit de la llum. Una vegada dissolt s'aliqota en tubs eppendorfs i s'emmagatzema a -20 °C.

Tampó fosfat

NaH₂PO₄ 0,2 M

Na₂HPO₄ 0,2 M

H₂O mQ q.s.p 100 ml

Ajustar el pH a 7,5 i conservar-lo a 4 °C.

• **Assaig de l'activitat luciferasa**

Al posar en contacte extractes de cèl·lules transfectades amb constructes derivats del plasmidi pGL3-Basic amb luciferina, la luciferasa expressada la utilitza com a substrat donant luminescència, que pot ser detectada en un luminòmetre. El protocol seguit ha estat el de *Luciferase Assay Systems* (Promega) i el luminòmetre utilitzat el *Luminometer Turner Design TD-20/20*.

PROTOCOL:

1. Obtenció del lisat cel·lular.

2. Introduir 5 μ l de mostra en els tubs de propilè, adequats pel luminòmetre, en què prèviament hem introduït 25 μ l de reactiu de luciferasa.

3. El tub es col·loca al luminòmetre per llegir la luminescència.

El reactiu per a la reacció de luciferasa (*Luciferase Assay Reagent*, 1 X) es prepara prèviament afegint el tampó (*Luciferase Assay Buffer*) al vial on hi ha el substrat de la luciferasa liofilitzat (*Luciferase Assay Substrate*). La mescla s'aliqota en tubs eppendorfs, que s'emmagatzemen a -80 °C, protegits de la llum.

- **Anàlisi de les dades**

Una vegada s'han realitzat els assajos de β -galactosidasa i luciferasa amb els extractes cel·lulars, es calcula el quocient entre l'activitat luciferasa i l'activitat β -galactosidasa, i es representen els valors corresponents per obtenir el grau d'inducció o repressió de l'activitat promotora del constructe reporter.

2.2.8.C Fixació de cèl·lules i immunodetecció

PROTOCOL:

1. Rentar les cèl·lules transfectades amb 1 ml (volum necessari perquè quedin cobertes les cèl·lules, en aquest cas utilitzem les plaques de 6 pous) de PBS 1 X tres vegades.
2. Incubar-les amb 1 ml del reactiu fixador (paraformaldehid al 4 % (w/v) en PBS 1 X) durant 10 minuts.
3. Rentar tres vegades les cèl·lules amb 1 ml PBS 1 X.
(Les tres primeres etapes es duen a terme a 4 °C)
4. Incubar les cèl·lules amb 1 ml de tampó de permeabilització durant 15 minuts.
5. Dipositar 100 μ l de solució d'anticòs primari (1/300) sobre parafilm i col·locar el cubreobjectes de manera que les cèl·lules contactin amb l'anticòs. Deixar contactant durant 50 minuts. És important crear una atmosfera humida mitjançant la utilització de paper de filtre *Watmann* mullat en H₂O mQ com a base del parafilm i mantenir el muntatge tapat.
6. Rentar les cèl·lules tres vegades amb 1 ml de tampó de permeabilització.
7. Procedir de la mateixa manera que en el pas 5 però, en aquest cas, afegir 100 μ l de solució d'anticòs secundari (1/25) i protegir el muntatge de la llum. Incubar durant 45 minuts.
8. Rentar 3 vegades amb 1 ml de tampó de permeabilització.
9. Fixar les cèl·lules. Per procedir a la fixació afegir sobre un portaobjectes 30 μ l de *mowiol* 40-88 (Sigma), i dipositar el cubreobjectes amb les cèl·lules. Deixar assecar durant 20 minuts a 80 °C.
10. Mantenir la mostra assecada a 4 °C i protegida de la llum.

SOLUCIONS:

Tampó de permeabilització:

Tritó X-100	0.1 %
Llet descremada	3 %
PBS	1 X

Solució d'anticòs primari:

Dissoldre l'anticòs en tampó de permeabilització en relació 1/300

Solució d'anticòs secundari:

Dissoldre l'anticòs en tampó de permeabilització en relació 1/25.

2.2.9 CONSTRUCCIÓ DE PLASMIDIS REPORTERS AMB DIFERENTS FRAGMENTS DEL PROMOTOR DE *GCK* DE FETGE D'ORADA

Se subclonen fragments del promotor de diferents mides en el plasmidi reporter pGL3-Basic (Promega), adequat per analitzar l'activitat promotora en cèl·lules eucariotes. Aquest plasmidi és un vector mancat de promotor eucariòtic i de seqüències *enhancer*. El plasmidi pGL3-Basic conté el gen de la luciferasa de la cuca de llum (*Photinus pyralis*), que s'utilitza com a gen reporter per donar a conèixer l'activitat promotora dels diferents

fragments inserits en el *multicloning site* d'aquest vector. Els constructes es van obtenir mitjançant la utilització, en tots els casos, de la reacció de lligació, que es va efectuar seguint el protocol descrit a l'apartat 2.2.1.E.

2.2.9.A Constructe pGK606

El fragment del promotor localitzat entre les posicions -606 i +76 respecte l'inici de transcripció fou generat per PCR, utilitzant el pGEM-GK1400 com a motllo i els oligonucleòtids ME0107 i ME0004. El fragment obtingut es va purificar mitjançant el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). Paral·lelament, el plasmidi pGL3-Basic es va sotmetre a digestió amb *Sma* I. El fragment del promotor amplificat i purificat fou subclonat en la diana *Sma* I del plasmidi pGL3-Basic (Promega) per generar el constructe pGK606 (de -606 a +76 respecte l'inici de transcripció).

CONDICIONS D'AMPLIFICACIÓ:

1. 94 °C 2 minuts
2. 94 °C 30 segons
3. 60 °C 30 segons
4. 72 °C 2 minuts
5. 34 cicles a partir del segon pas
6. 72 °C 5 minuts

2.2.9.B Constructe pGK1321

El constructe pGK1321 (de -1321 a +76 respecte l'inici de transcripció) fou generat per lligació del fragment resultant de la digestió amb *Nco* I/*Nde* I del constructe pGEM-GK1400, en el constructe pGK606 digerit amb *Mlu* I/*Nde* I. Per poder dur a terme aquesta lligació els extrems resultants de les digestions amb *Nco* I i *Mlu* I es convertiren prèviament en extrems roms; d'aquesta manera es varen fer compatibles els fragments per a la lligació.

2.2.9.C Constructes pGK288 i pGK21

Tant el constructe pGK288 (de -288 a +76 respecte l'inici de transcripció) com el pGK21 (de -21 a +76 respecte l'inici de transcripció) van ser generats mitjançant autolligació del propi plasmidi pGK606 després de ser digerit amb *Eco*R V/*Nhe* I i *Pvu* II/*Nhe* I, respectivament. Per fer compatibles les dianes, els extrems generats per la restricció enzimàtica van ser sotmesos a reompliment amb l'activitat polimerasa de *Klenow*.

2.2.9.D Constructes pGK72 i pGK72mutSp1

Els constructes pGK72 (de -72 a +76 respecte l'inici de transcripció) i pGK72mutSp (de -72 a +76 respecte l'inici de transcripció, amb la caixa Sp mutada) foren generats mitjançant amplificació per PCR utilitzant com a motllo el constructe pGK606, i com a encebadors els parells ME0202 /GLP2 i ME0310/GLP2 respectivament. Els productes de les reaccions de PCR foren subclonats en les dianes *Sma*I/*Hind*III de pGL3-Basic.

CONDICIONS DE L'AMPLIFICACIÓ:

1. 94 °C 1 minut 30 segons
2. 94 °C 30 segons
3. 60 °C 1 minut
4. 72 °C 1 minut
5. 29 cicles a partir del 2^a etapa
6. 72 °C 10 minuts

2.2.9.E Constructes pGK105, pGK105mutSRE

Els constructes pGK105 (de -105 a +76 respecte l'inici de transcripció) i pGK105mutSRE (de -105 a +76 respecte l'inici de transcripció, amb la caixa SRE mutada) foren generats mitjançant amplificació per PCR utilitzant com a motllo el constructe pGK606, i com a encebadors els parells ME0404 /GLP2 i ME0104/GLP2 respectivament. Els productes de les reaccions de PCR foren subclonats en les dianes *SmaI/HindIII* del pGL3-Basic.

CONDICIONS DE L'AMPLIFICACIÓ:

1. 94 °C 1 minut 30 segons
2. 94 °C 30 segons
3. 60 °C 1 minut
4. 72 °C 1 minut
5. 29 cicles a partir de la 2^a etapa
6. 72 °C 10 minuts

2.2.9.F Constructe pGK606Δ288-21

El constructe pGK606Δ288-21 (de -1321 a +76 respecte l'inici de transcripció, amb una delecció del fragment comprès entre -288 i -21) es va obtenir per autolligació del pGK606, prèviament digerit amb *EcoRV/PvuII*; fou eliminat, així, el fragment comprès entre -21 i -288 pb respecte l'inici de transcripció.

2.2.9.G Construcció d'un plasmidi reporter amb el promotor de GCK de fetge de rata (prGK1418):

El fragment del promotor localitzat entre les posicions -1418 a + 109 respecte l'inici de transcripció del gen *GCK* de rata fou generat per PCR, a partir de DNA genòmic de rata (obtingut mitjançant el *Wizart Genomic DNA purification kit*, Promega) i els oligonucleòtids ME0503 i ME0504. El fragment obtingut es va purificar mitjançant el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). Paral·lelament, el plasmidi pGL3-Basic es va sotmetre a digestió amb *Sma I*. El fragment del promotor amplificat i purificat fou subclonat en la diana *Sma I* del plasmidi pGL3-Basic (Promega) per generar el constructe prGK1418.

CONDICIONS DE L'AMPLIFICACIÓ:

1. 94 °C 1 minut 30 segons
2. 94 °C 30 segons
3. 60 °C 1 minut
4. 72 °C 2 minuts
5. 29 cicles a partir de la 2^a etapa
6. 72 °C 10 minuts

2.2.10 CONSTRUCCIÓ DELS PLASMIDIS QUE CODIFIQUEN PER A LA PROTEÏNA DE FUSIÓ GFP-GCK

Es va obtenir un constructe que conté el cDNA que codifica per a GCK de fetge d'*Sparus aurata* fusionat a l'extrem C-terminal de la seqüència que codifica per a la GFP.

La seqüència codificant de *GCK* de fetge d'orada es va obtenir mitjançant una reacció de PCR (apartat 2.2.1.C) utilitzant els oligonucleòtids PROGB1 i Mi0303 i el constructe pET3-GK com a motllo. El fragment amplificat fou clonat en el plasmidi *pGEM-Teasy*, i seqüenciat posteriorment.

El constructe obtingut (pGEM-GK) fou digerit amb els enzims de restricció *Bam HI* i *EcoRI*. El fragment resultant de la digestió se subclonà en el plasmidi pEGFPC₃ prèviament linealitzat amb la mateixa combinació d'enzims.

El plasmidi pEGFPC₃ conté la seqüència codificant per a la GFP, de tal manera que la GCK seria fusionada a l'extrem C-terminal de la seqüència codificant per a la GFP.

El plasmidi resultant de la lligació fou anomenat pEGFP-C₃/GK.

CONDICIONS DE LA REACCIÓ DE PCR:

1. 94 °C 2 minuts
2. 94 °C 25 segons
3. 60 °C 30 segons
4. 72 °C 2,5 minuts
5. 39 cicles a partir de la 2^a etapa
6. 72 °C 5 minuts

2.2.11 ANÀLISI ESTADÍSTIC DE LES DADES

L'anàlisi estadístic dels resultats s'ha efectuat amb el programa *Statview* (*Abacus Concepts, Berkeley, CA*). Per determinar si les diferències entre les condicions experimentals són significatives s'ha utilitzat el *Duncan multiple range test*.

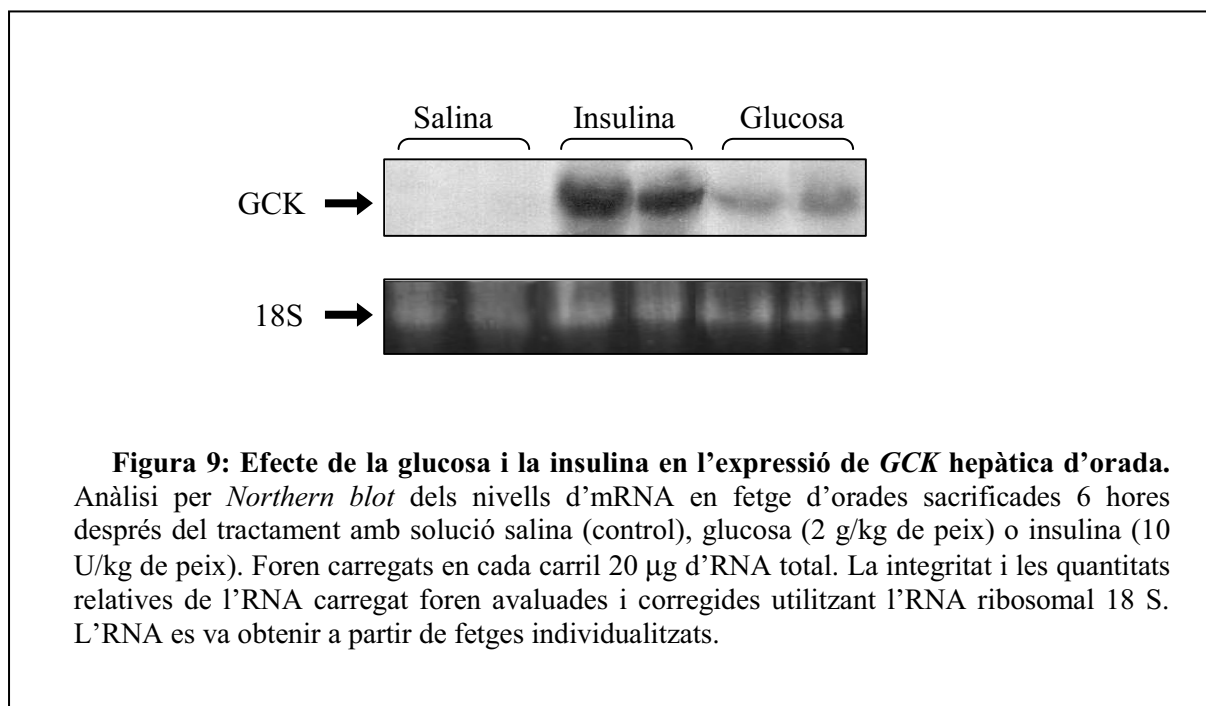
3. RESULTATS

3.1 EFFECTE DE LA GLUCOSA I LA INSULINA SOBRE L'EXPRESSION DE GCK

Els peixos carnívors presenten una baixa capacitat per controlar els nivells de glucèmia (Cowey i Walton, 1989; Wilson R.P., 1994; Panserat i col·l, 2002). Aquest fet s'atribuïa, en part, a l'absència d'activitat GCK en fetge de peixos (Moon TW., 2001). Estudis recents han permès clonar el cDNA que codifica per a la GCK de diferents espècies de peixos com: orada (*Sparus aurata*), truita (*Oncorhynchus mykiss*) i carpa (*Cyprinus carpio*) (Caseras i col·l, 2000; Panserat i col·l, 2000a). S'ha demostrat que el cDNA clonat d'orada dona lloc a un enzim GCK funcional (Caseras i col·l, 2000). La caracterització de la GCK hepàtica de peixos mostra que l'expressió de l'enzim està regulada en resposta a canvis nutricionals, de manera similar a l'enzim de mamífers (Niemeyer i col·l, 1975; Weinhouse i col·l, 1976; Iynedjian i col·l, 1988, 1989, 1993; Magnuson i col·l, 1989a; Metón i col·l, 1999b, 2000a, 2004; Caseras i col·l, 2000, 2002; Panserat i col·l, 2000c, 2001; Capilla i col·l, 2003). Estats de dejú i de restricció energètica en orades promouen un descens en l'expressió de GCK hepàtica, tant a nivell d'mRNA com a nivell d'activitat enzimàtica (Caseras i col·l, 2002). En aquestes situacions el flux metabòlic es veuria afavorit en sentit de la gluconeogènesi. L'administració de dietes d'elevat contingut en carbohidrats condueixen a un increment en l'expressió de GCK hepàtica d'orada a nivell d'mRNA i activitat, aquestes dietes promouen un increment de la via glucolítica (Metón i col·l, 1999b). Existeix modulació postprandial de l'expressió hepàtica de GCK d'orada, assolint-se nivells màxims després de 6-8 hores de la ingesta (Caseras i col·l, 2002). Aquests estudis mostren que l'expressió de la GCK d'orada està regulada per diferents condicions nutricionals (Caseras i col·l, 2002). En aquest context, ens vam plantejar estudiar l'efecte de l'administració d'insulina i glucosa sobre l'expressió de la GCK. En peixos, l'acció d'insulina sobre l'expressió de GCK no havia estat encara estudiada. S'havia suggerit que la deficient secreció d'insulina podia ser una de les causes de la baixa expressió de GCK en peixos (Palmer i col·l, 1972; Fuirichi i col·l, 1981). Pel contrari, estudis posteriors indiquen que la concentració d'insulina en plasma és superior en peixos que en mamífers (Mommsen i Plisetskaya 1991; Carneiro i col·l, 1993; Blasco i col·l, 1996). A més, s'ha descrit que dietes riques en carbohidrats indueixen increments en la concentració plasmàtica d'insulina en peixos (Párrizas i col·l, 1994a).

Per avaluar l'efecte de l'administració d'insulina i glucosa sobre l'expressió de GCK en fetge d'orades, tres grups de peixos van ser tractats mitjançant una injecció intraperitoneal amb solució salina, insulina o bé glucosa. Les orades van ser alimentades amb dieta DIBAQ (de contingut intermedi de proteïnes i carbohidrats) subministrada a l'1 % del pes corporal. Les condicions de l'experiment i la composició de la dieta estan descrites a l'apartat 2.1.1.A.2. Sis hores després del tractament se sacrificaren les orades i se'n va extreure l'RNA a partir de teixit hepàtic (apartat 2.2.4.A)

Experiments de *Northern blot* mostren que l'expressió de *GCK* hepàtica d'orada està regulada en resposta a insulina i glucosa. Mentre que en peixos alimentats tractats amb solució salina els nivells d'expressió de *GCK* són pràcticament indetectables, el tractament d'orades amb insulina incrementa significativament els nivells d'mRNA de *GCK* (figura 9). Així mateix, tot i que en menor intensitat, també s'observa un increment dels nivells d'mRNA de *GCK* en orades tractades amb glucosa en relació a orades tractades amb solució salina.



Els nivells de glucèmia es van veure afectats també pel tractament amb glucosa i insulina, essent de 146,51 mg/dl \pm 6,08 (n=5) en orades tractades amb solució salina, de 79,44 mg/dl \pm 14,85 (n=6) en orades tractades amb insulina i de 1682,3 mg/dl \pm 684,04 SD (n=6) en orades tractades amb glucosa.

3.2 ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE *GCK* EN DIFERENTS TEIXITS

A partir d'RNA total aïllat d'orades alimentades, i mitjançant la tècnica d'RT-PCR s'ha determinat l'expressió de *GCK* en diferents teixits: fetge, cervell, cor, múscul esquelètic, ronyons, brànquies, intestí i melsa. Aquest estudi revela que la *GCK* s'expressa fonamentalment en fetge (figura 10). La utilització d'oligonucleòtids específics per a la *GCK* (GK1 i GK2) ens va permetre detectar un fragment de la mida esperada (189 pb) en el carril corresponent a fetge, mentre que no es va observar senyal en els carrils corresponents als altres teixits analitzats.

Com a control de la integritat de l'RNA es va utilitzar β -actina d'*Sparus aurata*, mitjançant la utilització d'oligonucleòtids específics es va amplificar un fragment de 711 pb. La tècnica d'RT-PCR es va dur a terme seguint les indicacions de l'apartat 2.2.1.K.

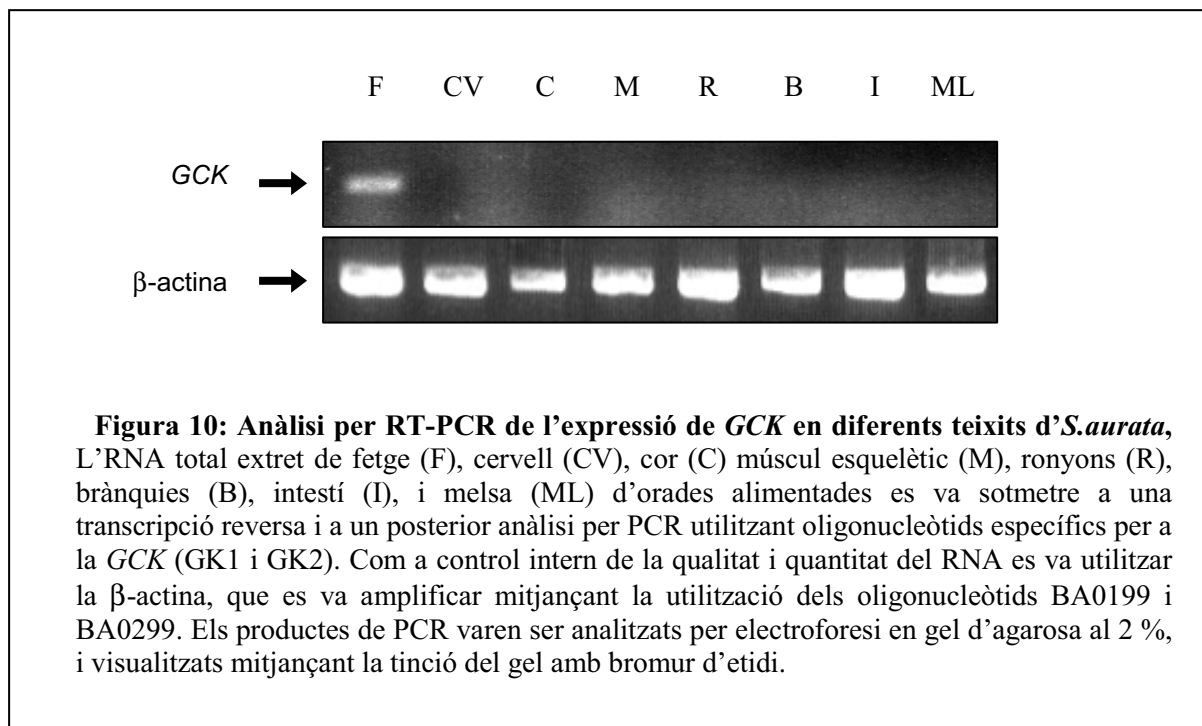


Figura 10: Anàlisi per RT-PCR de l'expressió de GCK en diferents teixits d'*S.aurata*. L'RNA total extret de fetge (F), cervell (CV), cor (C) múscul esquelètic (M), ronyons (R), brànquies (B), intestí (I), i melsa (ML) d'orades alimentades es va sotmetre a una transcripció reversa i a un posterior anàlisi per PCR utilitzant oligonucleòtids específics per a la GCK (GK1 i GK2). Com a control intern de la qualitat i quantitat del RNA es va utilitzar la β -actina, que es va amplificar mitjançant la utilització dels oligonucleòtids BA0199 i BA0299. Els productes de PCR varen ser analitzats per electroforesi en gel d'agarosa al 2 %, i visualitzats mitjançant la tinció del gel amb bromur d'etidi.

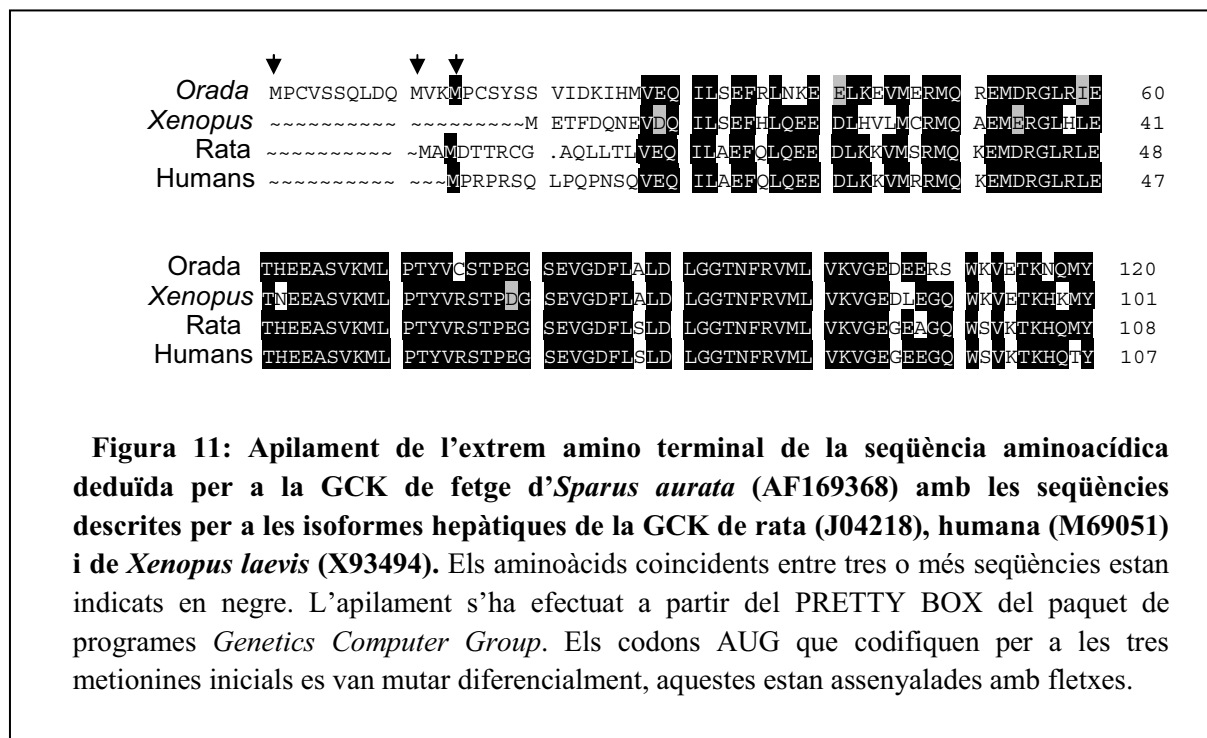
3.3 DETERMINACIÓ DE L'INICI DE TRADUCCIÓ:

L'extrem N-terminal de la seqüència aminoacídica deduïda per a la GCK hepàtica d'*Sparus aurata* presenta baixa homologia amb les corresponents GCK descrites per a altres vertebrats (rata, *Xenopus laevis* i humans) (figura 11). La seqüència de la GCK de fetge d'orada té l'extrem amino terminal més llarg descrit fins ara.

Donat que el primer AUG en la seqüència d'mRNA es troba en un context de baixa homologia respecte la seqüència *consensus* Kozak (1987) (GCC) GCCRCCAUGG (R= G o A), i la seqüència d'mRNA de la GCK de fetge d'orada presenta en el seu extrem 5' tres codons AUG en fase, vàrem decidir analitzar si l'inici de traducció era dirigit per un codó AUG diferent del primer.

Per dur a terme aquest estudi es va utilitzar la tècnica de transcripció/traducció *in vitro* (apartat 2.2.3). Es van dissenyar oligonucleòtids (ME0104, ME0105, Mi0201) per obtenir plasmidis d'expressió de GCK en els que els tres AUG inicials localitzats en l'extrem 5' del missatger estaven mutats diferencialment, i permetien així la possible traducció alternativa des del primer, segon i/o tercer codó AUG. Mitjançant PCR, es van obtenir diferents GCK mutades, que es van clonar posteriorment en un plasmidi que permet la transcripció/traducció *in vitro* (pcDNA₃, plasmidi descrit a l'apartat 2.1.4.A). El constructe pcDNA₃-GK1 manté

conservats com el *wt*, el segon i tercer AUG. En el cas de pcDNA₃-GK2 només conserva el tercer AUG. Finalment, en el constructe pcDNA₃-GK3, la GCK presenta conservats el primer i el segon AUG.

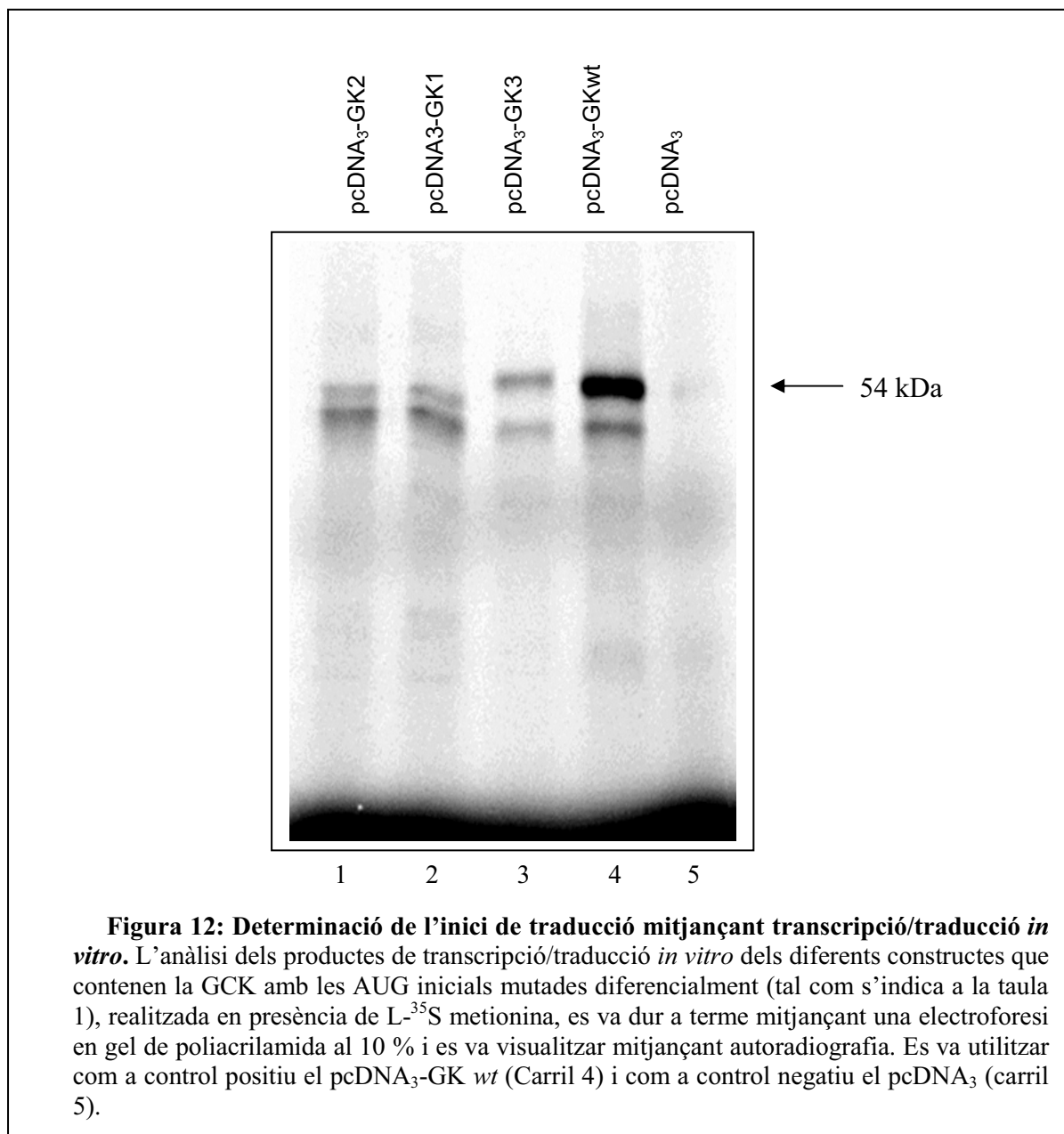


Constructes	Oligonucleòtids	primer AUG	segon AUG	tercer AUG
pcDNA ₃ -GK1	ME0104	deleccionat	wt	wt
pcDNA ₃ -GK2	ME0105	deleccionat	mutat (CTG)	wt
pcDNA ₃ -GK3	Mi0201	wt	wt	mutat (CTG)

Taula 1: Descripció dels oligonucleòtids utilitzats per a cada constructe. El constructe pcDNA₃-GK1 conté el primer codó AUG deleccionat. El constructe pcDNA₃-GK2 presenta el primer codó AUG deleccionat i el segon mutat. El pcDNA₃-GK3 presenta mutat el tercer codó AUG.

Una vegada obtinguts els diferents constructes, es realitzaren assajos de transcripció /traducció *in vitro*. Es va utilitzar com a control negatiu el plasmidi pcDNA₃ buit, i com a control positiu pcDNA₃-GK *wt*. L'expressió de la GCK hepàtica d'orada en cèl·lules d' *E. Coli* va donar lloc a una proteïna de 54 kDa detectada per *Western blot* (Caseras A., 2000).

Els resultats obtinguts mitjançant experiments de transcripció/traducció *in vitro*, indiquen que dels constructes mutats, només pcDNA₃-GK3, què manté el primer AUG conservat, proporciona una proteïna de la mida equivalent a la proteïna formada a partir del constructe *wt*, 54 kDa (figura 12).



Quan el primer codó AUG no està present, com succeeix en el pcDNA₃-GK1 i/o pcDNA₃-GK2, la proteïna de 54 kDa no es forma, si bé apareix una banda de mida inferior. En absència del primer AUG, la traducció podria iniciar-se a partir del tercer codó, donant lloc a una isoforma truncada amb 13 aminoàcids menys a l'extrem amino terminal (carril 1 i 2). En tots els casos es genera una proteïna de mida inferior que podria correspondre a una forma de

processament alternatiu, tal com succeeix amb la GCK de rata (Magnuson i col·l, 1989b; Liang i col·l, 1991; Tanizawa i col·l, 1991), o a proteòlisi (carrils 1-4).

3.4 LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LA GCK

La GCK catalitza la primera reacció de la glucòlisi en el citoplasma cel·lular, fosforilant la glucosa a glu-6P. La GCK de mamífers està regulada per la GKR, que actua com a inhibidor fisiològic de GCK quan els nivells de glucosa són baixos o en presència de fru-6P (Van Schaftingen i Vandercammen, 1989b; Vandercammen i Van Schaftingen, 1991). S'ha descrit que la GKR està implicada en la localització subcel·lular de la GCK hepàtica de mamífers (Van Schaftingen i Vandercammen, 1989b; Vandercammen i Van Schaftingen, 1991; de la Iglesia i col·l, 1999; Shiota i col·l, 1999). En condicions de baixa concentració de glucosa la GCK és segrestada en estat inactiu en el nucli cel·lular mitjançant la interacció amb la GKR (Toyoda i col·l, 1994; Agius i col·l, 1995; Brown i col·l, 1997). En resposta a altes concentracions de glucosa, la GCK de mamífers es transloca al citoplasma on catalitza la fosforilació de la glucosa (Agius i col·l, 1993, 1995; Brown i col·l, 1997; Toyoda i col·l, 1997; de la Iglesia i col·l, 1999; Nordlie i col·l, 1999; Shiota i col·l, 1999).

Tot i que s'ha descrit que la GKR no existeix en peixos (Vandercammen i Van Schaftingen, 1993), els aminoàcids corresponents a la unió amb GKR estan altament conservats en la GCK de peixos. L'estudi de la seqüència aminoacídica de GCK d'*Sparus aurata*, *Oncorhynchus mykiss* i *Cyprinus carpio* mostra que conserven els aminoàcids importants per a la unió amb la GKR. En la figura 13 es mostra un alineament dels aminoàcids considerats importants per a la unió de GCK a GKR en rata, amb els residus corresponents d'*Sparus aurata*, *Oncorhynchus mykiss* i *Cyprinus carpio* (Veiga da Cunha i col·l, 1996 a,b; Moukil, i col·l, 2000).

Rata	E ⁵²	H ¹⁴¹	K ¹⁴²	K ¹⁴³	L ¹⁴⁴	V ²⁰³	N ²⁰⁴
<i>Sparus aurata</i>	E ⁶⁴	H ¹⁵³	K ¹⁵⁴	K ¹⁵⁵	L ¹⁵⁶	V ²¹⁵	N ²¹⁶
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	E ⁵⁶	H ¹⁴⁶	K ¹⁴⁷	K ¹⁴⁸	L ¹⁴⁹	V ²⁰⁸	N ²⁰⁹
<i>Cyprinus carpio</i>	E ⁶²	H ¹⁵¹	K ¹⁵²	K ¹⁵³	L ¹⁵⁴	V ²¹³	N ²¹⁴

Figura 13: Aminoàcids considerats importants per a la unió de GCK a GKR.

Dades obtingudes a partir de l'apilament de les seqüències corresponents a GCK hepàtica de rata (NP036697), orada (AAC33585), truita (AAC33586), i carpa (AAC33587).

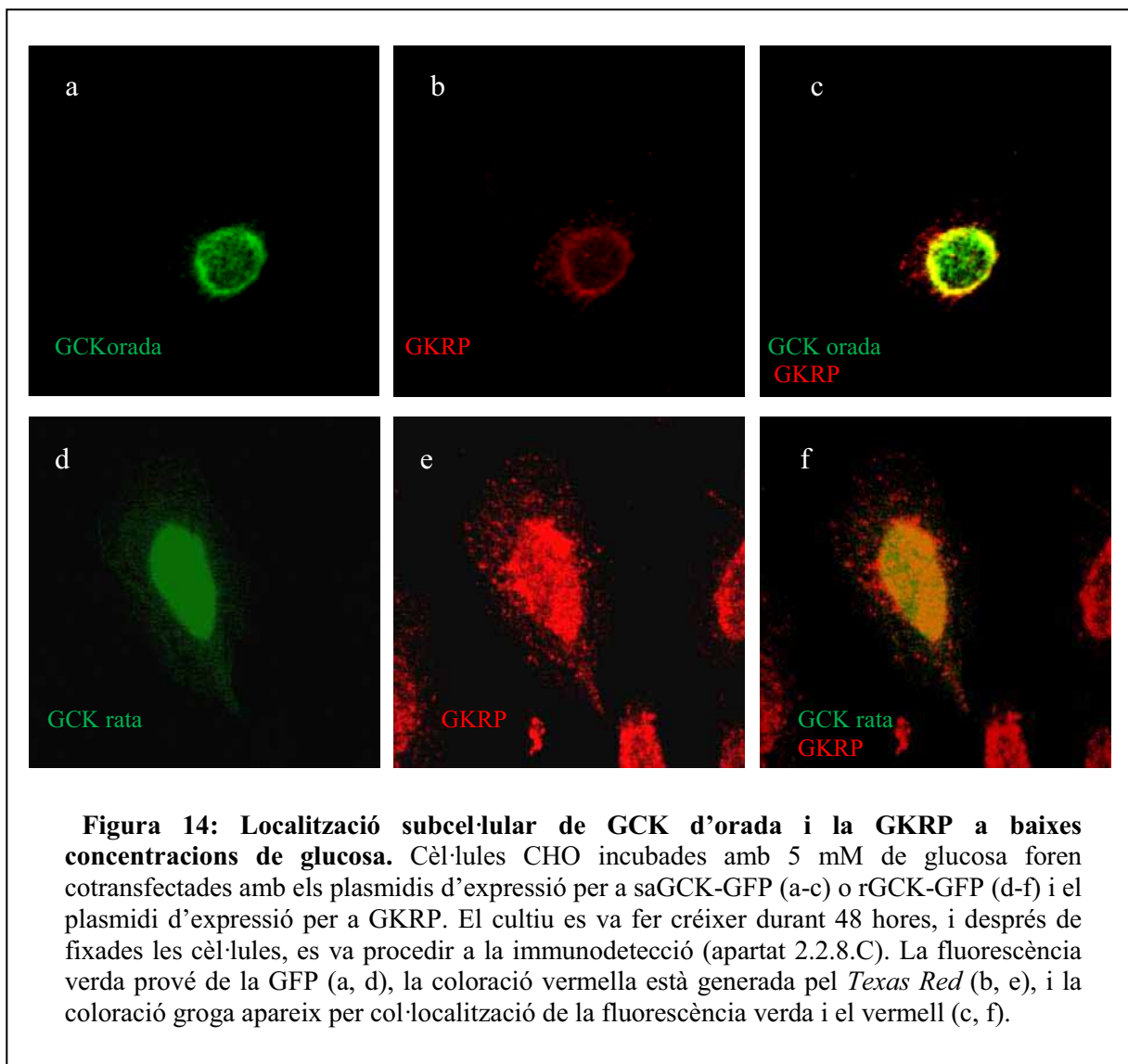
La GKR de rata inhibeix també les GCK hepàtiques de porc i de l'amfibi *Xenopus laevis* (Vandercammen i Van Schaftingen, 1991). La GKR de rata no actua, en canvi, sobre les HK

I-III, ni sobre la GCK de baixa K_m de *Bacillus stearothermophilus* (Vandercammen i Van Schaftingen, 1991).

Per tal de determinar si la GCK d'orada presenta capacitat de translocació en resposta a diferents concentracions de glucosa vam clonar la GCK d'orada en el plasmidi pEGFP-C₃, què codifica per a la GFP, de manera que la GCK estaria fusionada pel seu extrem C-terminal a la proteïna GFP (apartat 2.2.10). Es van dur a terme experiments de transfecció transitòria en cèl·lules CHO amb el plasmidi pEGFP-C₃/GKsa, què codifica per a la GCK d'orada fusionada a la GFP (saGCK-GFP); amb el constructe pEGFP-C₁/GKr (cedit per J.C. Ferrer, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona) què codifica per a la GCK de rata fusionada per l'extrem C-terminal a la GFP (rGCK-GFP); i amb el plasmidi pACC-GKRP, què codifica per a la GKRP de rata, (cedit per J.C. Ferrer). Les cèl·lules cotransfectades amb pACC-GKRP juntament amb els constructes pEGFP-C₃/GKsa o pEGFP-C₁/GKr es van incubar en presència de baixes concentracions de glucosa (5 mM) o elevades concentracions de glucosa (25 mM, 50 mM). Les cèl·lules cotransfectades amb el plasmidi d'expressió per a la GCK de rata es van utilitzar com a control positiu, ja que el seu comportament en resposta a diferents concentracions de glucosa ja havia estat descrit (de la Iglesia i col·l, 1999). Una vegada fixades les cèl·lules, la GKRP es va detectar mitjançant immunodetecció amb un anticòs secundari anti-GKRP conjugat amb *Texas Red* (cedit pel Dr. J. Guinovart, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona), què emet fluorescència vermella. Les proteïnes de fusió es van detectar mitjançant la fluorescència verda emesa per la GFP en ser il·luminada amb llum blava. El protocol de transfecció fixació i immunodetecció està descrit a l'apartat 2.2.8.C. Mitjançant microscopia confocal de fluorescència es va observar la localització subcel·lular de cada proteïna. La col·localització del verd (produït per la GFP) i el vermell (procedent del *Texas Red*) donava lloc a una coloració groga.

3.4.1 LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE GCK EN CONDICIONS DE BAIXA CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA

A fi d'estudiar la localització subcel·lular de GCK hepàtica d'orada en presència de baixa concentració de glucosa, es van incubar cèl·lules CHO en presència de 5 mM de glucosa (figura 14). Les cèl·lules es van cotransfectar amb els plasmidis pACC-GKRP i pEGFP-C₃/GKsa o pEGFP-C₁/GKr. Una vegada transcorregudes 48 hores es van fixar les cèl·lules i es va procedir a la immunodetecció. Estudis de microscopia confocal de fluorescència amb cèl·lules CHO incubades amb 5 mM de glucosa mostren que tant la saGCK-GFP com la rGCK-GFP col·localitzen amb la GKRP de rata en el nucli cel·lular (figura 14 a-f). Els nostres resultats respecte la GCK d'orada estan d'acord amb observacions prèvies descrites per a la GCK de mamífers (Agius i col·l, 1993, 1995; Brown i col·l, 1997; Toyoda i col·l, 1997; de la Iglesia i col·l, 1999).



3.4.2 LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE GSK A ALTA CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA:

Per tal d'estudiar la localització de GSK de fetge d'orada a alta concentració de glucosa, es van incubar cèl·lules CHO en presència 25 mM i 50 mM de glucosa. Posteriorment es van cotransfectar les cèl·lules amb els plasmidis pACC-GKR i pEGFP-C₃/GKsa o pEGFP-C₁/GKr. Les cèl·lules es van fixar i posteriorment es van sotmetre a immunodetecció. Estudis de microscopia de fluorescència confocal mostren que tant en presència de 25 mM com de 50 mM de glucosa, la GKR (figures 15 b, c, e, f) i la saGSK-GFP (figures 15 a, c, d, f) es localitzen al citoplasma. Així mateix, la rGSK-GFP, tal com s'havia descrit prèviament (Brown i col·l, 1997; de la Iglesia i col·l, 1999), també es localitza al citoplasma en resposta a concentracions elevades de glucosa en presència de GKR (50 mM, figures 15 g, i).

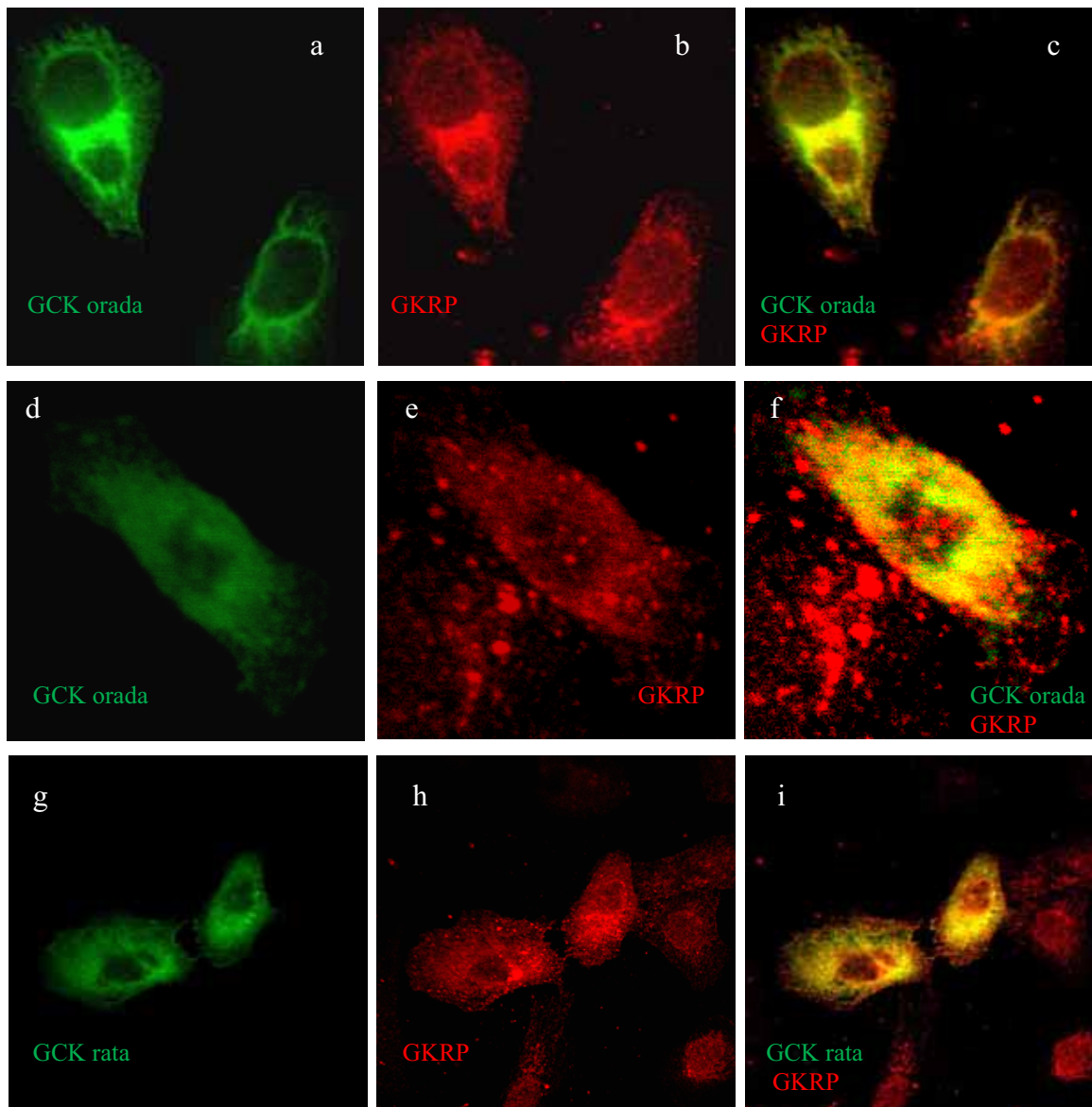


Figura 15: Localització subcel·lular de GCK i GKRPs en presència d'alta concentració de glucosa. Cèl·lules CHO incubades amb 25 mM (a-c) o 50 mM (d-i) de glucosa foren cotransfectades amb els plasmidis d'expressió per a GCK d'orada (saGCK-GFP; a-f) o de rata (rGCK-GFP; g-i) i el plasmidi d'expressió per a la GKRPs. Les cèl·lules es van fer créixer durant 48 hores, i es va procedir a la immunodetecció. La fluorescència verda prové de la GFP (a, d, g), la coloració vermella està generada pel *Texas Red* (b, e, h) i la coloració groga apareix en la col·localització entre la fluorescència verda i vermella (c, f, i).

Aquests resultats mostren que la GCK d'orada, en presència de la GKRPs de rata, presenta diferent localització en funció dels canvis en la concentració cel·lular de glucosa, de la mateixa manera com succeeix amb la GCK de rata. El fet que la localització de GCK d'orada

respongui a la regulació per la GGRP de rata a diferents concentracions de glucosa, indica que la localització de la GCK d'orada podria estar regulada per una proteïna homòloga a la GGRP de mamífers.

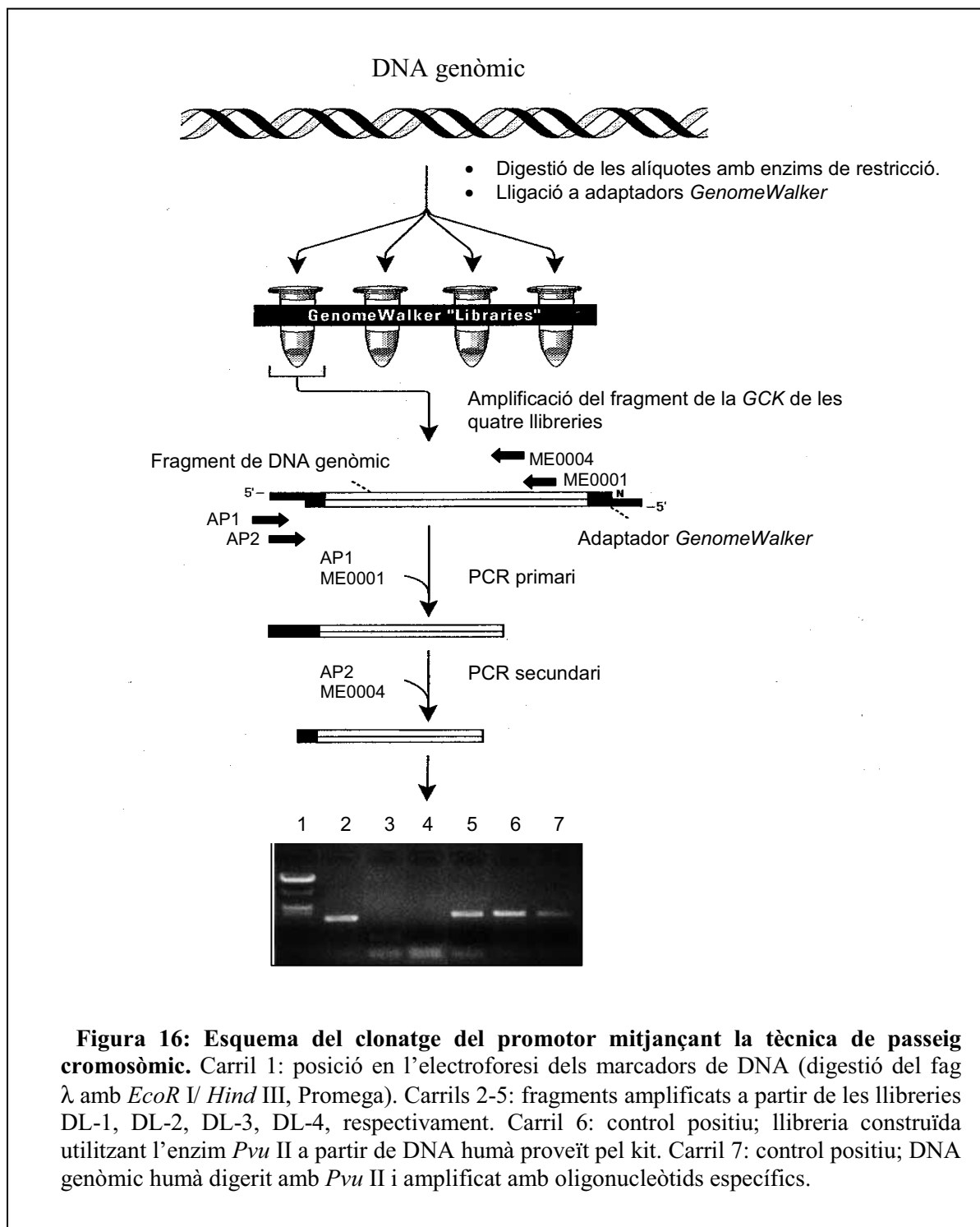
3.5 CLONATGE DEL PROMOTOR DE LA GCK D'ORADA

Els resultats derivats dels estudis de regulació nutricional (Caseras i col·l, 2002) i hormonal de l'expressió de GCK a fetge d'orada mostren que l'administració de glucosa o insulina, estats de realimentació després del dejú, situacions postprandials a curt termini i l'administració de dietes amb elevat contingut de carbohidrats promouen un increment en els nivells d'mRNA de GCK. Existeix, per tant, una modulació de l'expressió de *GCK* en fetge d'*Sparus aurata*. En aquest context, ens vam plantejar clonar el promotor de la GCK d'orada i estudiar els factors de transcripció implicats en la seva regulació transcripcional. Actualment, són encara pocs els estudis de clonatge de promotors i de regulació transcripcional en peixos.

Per aïllar la seqüència adjacent a l'extrem 5' del missatger de *GCK* de fetge d'orada vam utilitzar la tècnica del passeig cromosòmic, partint de DNA genòmic i utilitzant oligonucleòtids específics per a la *GCK* de fetge d'orada, tal com s'indica a l'apartat 2.1.5. En la figura 16 es mostra un esquema de la tècnica utilitzada.

El primer pas fou la construcció de 4 llibreries genòmiques obtingudes per digestió del DNA genòmic purificat de fetge d'orada, amb els enzims de restricció *Dra* I, *Eco*R V, *Pvu* II i *Stu* I. Les 4 llibreries genòmiques obtingudes, anomenades: DL-1, DL-2, DL-3 i DL-4 respectivament, es van analitzar mitjançant PCR utilitzant els oligonucleòtids del *kit* (apartat 2.1.5.D) i oligonucleòtids específics (apartat 2.1.5.A) dissenyats en base a la seqüència del cDNA de la *GCK* d'orada prèviament clonat (Caseras i col·l, 2000). Es va realitzar un PCR primari amb els encebadors externs AP1 (proveït pel *kit*) i ME0001 (oligonucleòtid específic). A continuació, es va dur a terme un PCR secundari partint del producte de PCR primari i utilitzant com a encebadors interns AP2 (proveït pel *kit*) i ME0004 (encebador específic).

Per determinar quina llibreria proporcionava el fragment de major longitud, s'analitzaren els diferents fragments obtinguts per PCR realitzant una electroforesi en gel d'agarosa a l'1 %, seguint les indicacions de l'apartat 2.2.1.A. La llibreria DL-1 va donar lloc a un fragment d'aproximadament 1150 pb. A partir de la llibreria DL-2 vam obtenir un fragment d'uns 400 pb. La llibreria DL-3 no va donar senyal. Finalment, varem observar un fragment d'aproximadament 1400 pb en l'amplificació de la llibreria DL-4 (figura 16).



Vam clonar el fragment més gran obtingut, d'uns 1400 pb, en el plasmidi pGEMTeasy (Promega) i posteriorment fou seqüenciat. El constructe obtingut es va anomenar pGEM-GK1400.

```

-1321 CCTTAACCTGCACCACACTGTTGTAGTTTGGAGGTTCATTCACCTCGCTGGAGCTAATTTGAGAGACATGTTTCTAA
-1241 TTTTAGCGAATTAGCAATAAAACAATATATGCGTAAATCTCACGGCCCTCGGAAGCTCCCTCACTGAGCAACCCCTGTGG
-1161 CCTTCATCTTGCTCTTATGCAATAGAAAAGTTCAGAACAAGGTTAACATCTGAGATTTTAAACCCTCGCAGTAACTG
-1081 AAAATCACAGACATTATTGTGAGATGTGATTTAAAAAATGTTTGTGGTGTGTTAATTAAGAGAAAAAAGAAAAGGA
-1001 AAAATTGGGCTGAAAATTGCTTTTTCAAGTGGTTGAAAAGCAACTGAAATTGAAGTCAGACAAAAGTCACAAACAGAGTA
-921 CCCCAAACGTATCTAAATATGTCACAAAATCGGAATGTGATTAGAAAAATGACATCAAACCATTTGAAATCTCACCATT
-841 ATAACCTGAGGATCCATAAAACCTATAGTTCAAACTGTACATATATTGTGAATAACTAAGACATGCATTGAACTAATCAGCA
-761 TCTCTTACTTGATCATCTTCTATTTGTTCTTATAAACATGCAACATTTCTCATATTGTGACCAAATTTTATTGTTGCC
-681 TCTGGTCGATGCTATAATGTGCCCAGGAGCAAATCTAATCGATATGCAAAGTCTTTTATTCCATCTGCCATCAAACCTCT
-601 AAATTCAGACCCCACTAATTTTAGAAGAATTGAACTTATTATTTACTCATTAAATTTATTTATTTATGACGTACCCA
-521 TGTGCTCTTAAATGTTTCTGACTGACTGAATGAATGATCGTTGTAATGATTTTATGTTTTTAAATGTTTGTATGTCTGG
-441 AAAAGCTACAATAAATGCCCATTGGGATAAATAAAGTGGTCTGAACTGAACTGAGCTGAACTTCTCATATTGTTCT
-361 TAGAGCCCTATAAAACAAACAGATTAGGCATATGAATATATACATTATATAAATCCATCCAAATGCTCAATGATATCTGTA
-281 CATTGTCCTCCCTGCAATAAAAAACAACGTCTTAAAATGTAATCTTACTTTGCAGTAAAGTATGTCAGGTAGACTTGA
-201 ACTTTGGGTATTCTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGTGGTGTGTGTGTGCGG
-121 GTGTCCGAACCCCCACGATCACCAGATGGGGCGAGATCGGGGAAGGGGTGGGCCTTACGTGCGGTGTGGCCAGCCCACT

↪
-41 TCACCTGAGCATAAAAAACAGCTGAAGTTCTCATTAGGGCTATTACACTTGAAGCTGCTGCACACACAGTCTGGAC
+40 ACACACTCACCACACCTAGAGACATAACCGAGGctcatttagtcaaacctgaggagatg

```

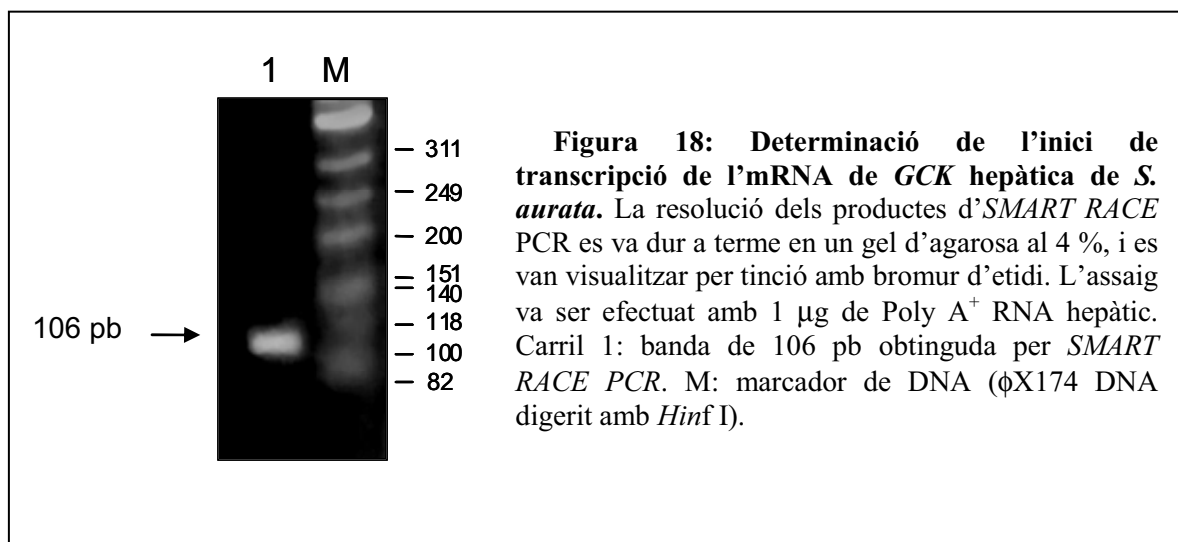
Figura 17: Fragment aïllat per passeig cromosòmic de la seqüència nucleotídica adjacent a l'extrem 5' de *GCK* d'*Sparus aurata*. El número d'accés en el DDBJ/EMBL/GeneBank és AY206500. Les lletres majúscules indiquen la regió clonada utilitzant la tècnica del passeig cromosòmic. Les minúscules corresponen al cDNA prèviament clonat (Caseras i col·l, 2000). L'inici de transcripció s'indica amb una fletxa. En negreta i subratllat s'assenyala el codó iniciador de la traducció.

La seqüència nucleotídica fou sotmesa a les bases de dades de DDBJ/EMBL/GeneBank amb el número d'accés AY206500 (figura 17). Estudis informàtics mostren que la seqüència obtinguda presenta baixa homologia respecte als promotors de la *GCK* d'humans, rata i ratolí (Magnuson i col·l, 1990; Postic i col·l, 1995; Iynedjian i col·l, 1996).

3.6 **DETERMINACIÓ DE L'INICI DE TRANSCRIPCIÓ:**

L'inici de transcripció de l'mRNA de *GCK* fou determinat mitjançant la tècnica d'*SMART RACE PCR* (figura 18). A partir d'RNA Poly A⁺ i mitjançant la combinació d'oligonucleòtids ME0001 /UPMA (PCR primari) i ME0004/NUP (PCR secundari) es va obtenir una banda de 106 pb que fou clonada en el pGEM *Teasy* (protocols descrits a l'apartat 2.2.2). Una vegada seqüenciat, vam observar que el fragment obtingut mostrava homologia amb els 47 pb respecte la regió *UTR* (*untranslated region*) del cDNA de *GCK* de fetge

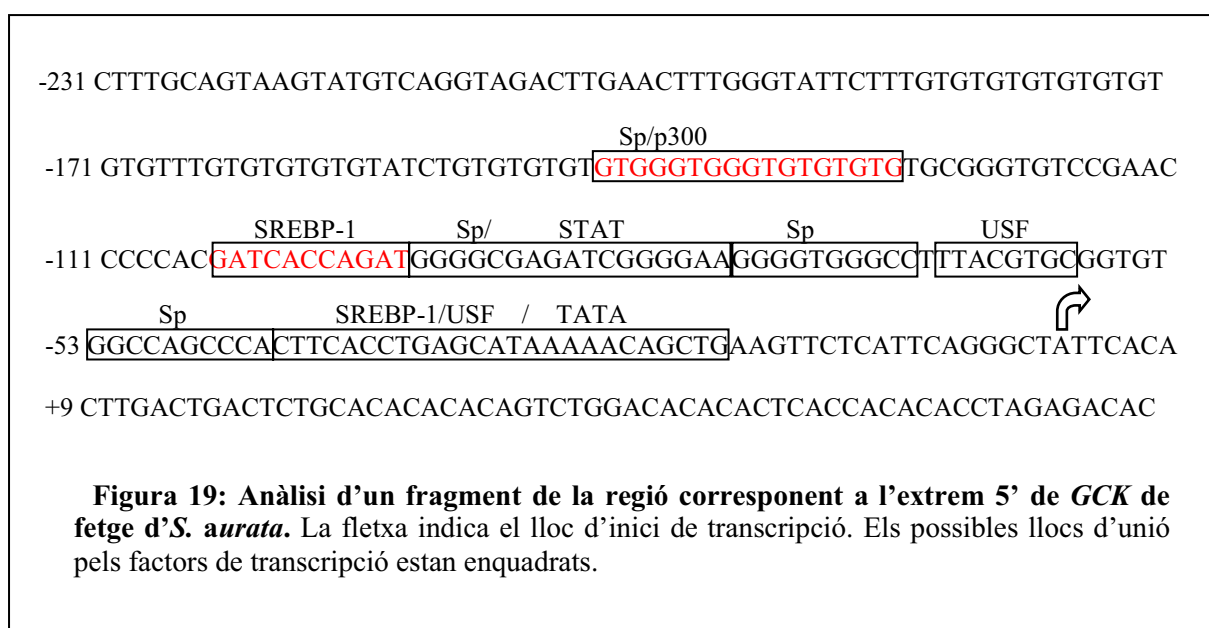
d'*Sparus aurata* clonat prèviament per Caseras i col·l (2000), fet que confirmava que el fragment aïllat corresponia a l'extrem 5' del cDNA del missatger de GCK d'orada. L'anàlisi de dos clons independents indicà que l'inici de transcripció està situat 98 nucleòtids corrent amunt respecte el codó d'iniciació per a la traducció.



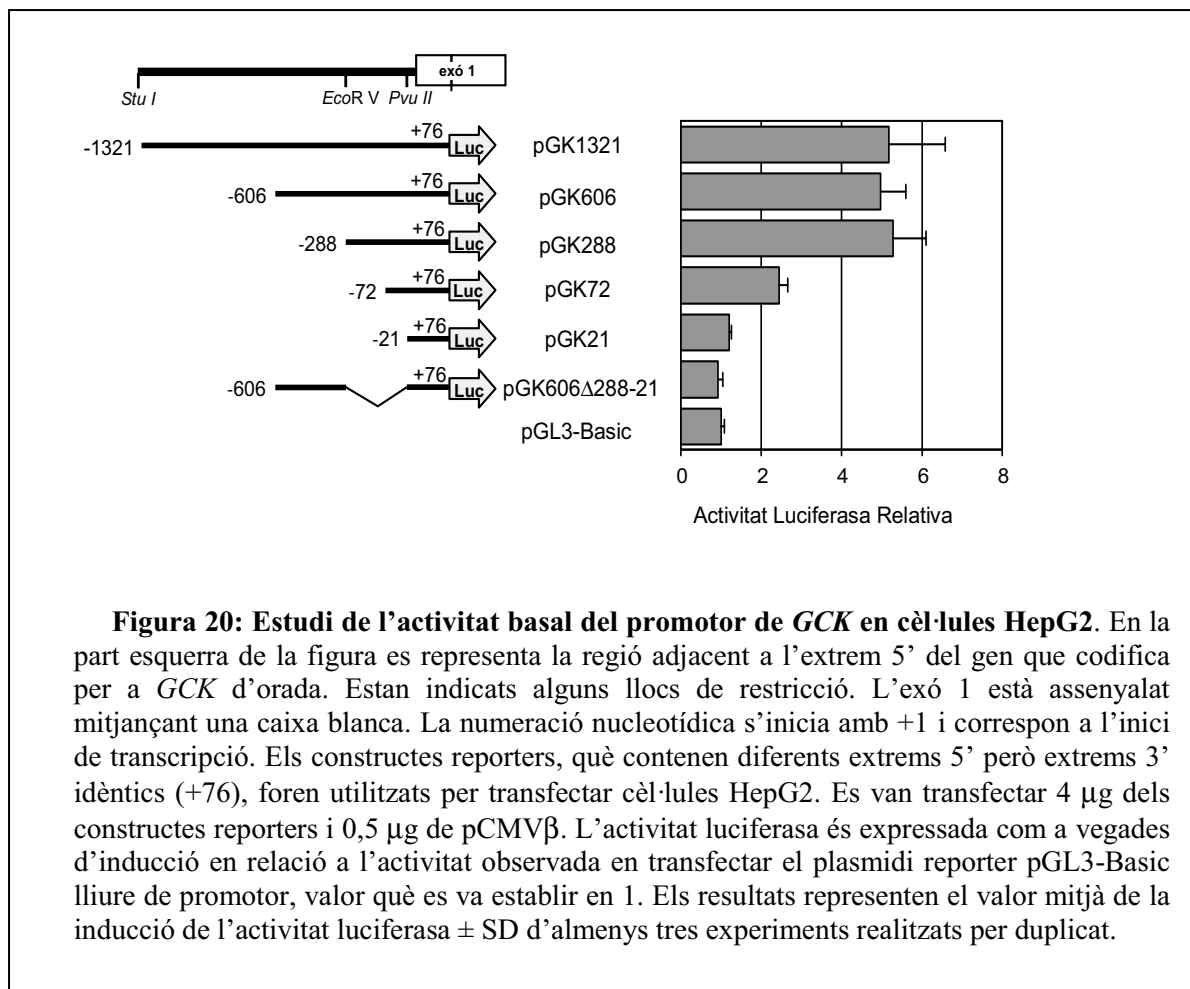
3.7 FUNCIONALITAT DEL PROMOTOR DE LA GCK D'ORADA

L'anàlisi de la seqüència de 1397 pb adjacent a l'extrem 5' del cDNA que codifica per a la GCK de fetge d'orada mitjançant el programa informàtic MOTIF-TRANSFAC 6.0 (Heinemeyer i col·l, 1999), revela la presència d'una caixa TATA situada entre els pb -33 a -19 respecte l'inici de transcripció. Així mateix indica la presència de possibles llocs d'unió per a factors de transcripció, entre els quals podem destacar: Sp, USF, p300, SREBP-1 i proteïnes STAT (figura 19).

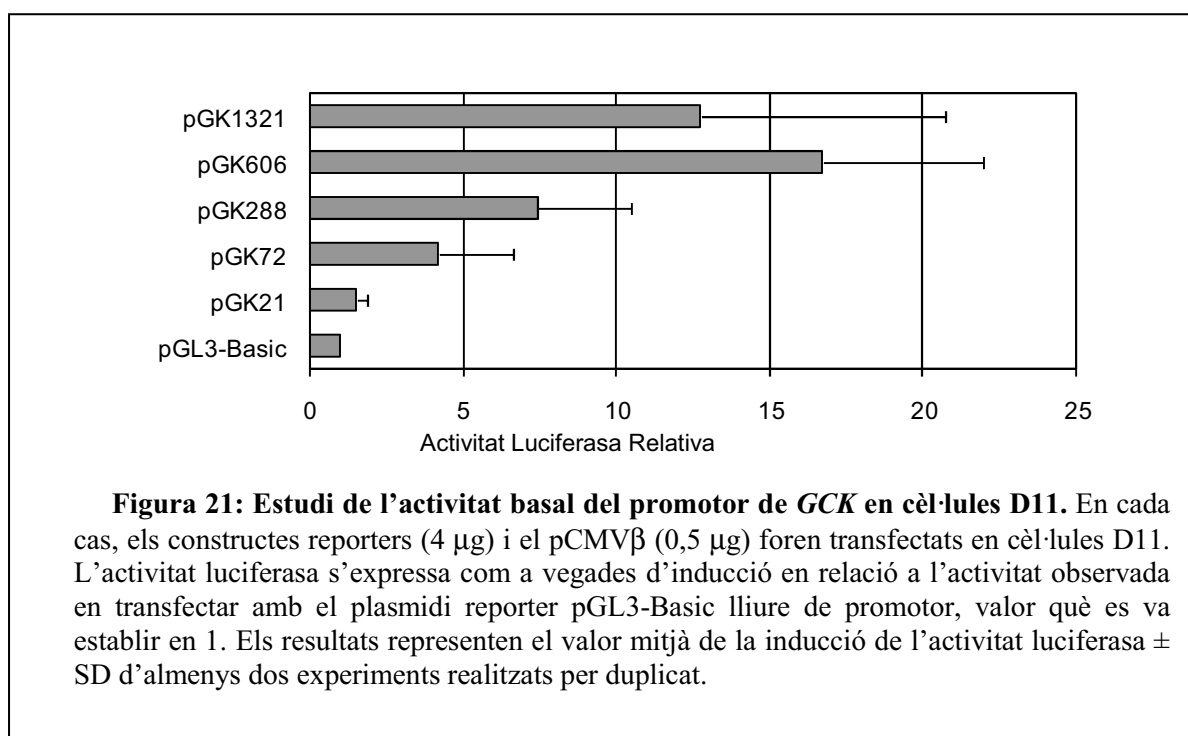
A partir del constructe pGEM-GK1400 i mitjançant digestió amb enzims de restricció es va dur a terme el suclonatge d'un fragment de 1321 pb en el vector pGL3Basic (apartat 2.2.9.B). El constructe obtingut es va anomenar pGK1321 (comprèn els nucleòtids que van des de la posició -1321 fins +76 en relació a l'origen de transcripció de la GCK hepàtica d'orada). La utilització del plasmidi pGL3-Basic ens va permetre determinar si la regió de DNA genòmic flanquejat a l'exó 1 conté un promotor funcional.



Per tal d'examinar les regions del promotor implicades en la modulació de l'expressió basal de *GCK* en orada es van dur a terme deleccions de l'extrem 5' del fragment del promotor, mitjançant la utilització d'enzims de restricció o amplificació per PCR. Els fragments 5' deleccionats des de -1321 fins a -21 pb (mantenint +76 com a extrem 3') foren fusionats al gen reporter de la luciferasa en el plasmidi pGL3Basic. Es van obtenir així els constructes pGK606 (de -606 a +76 pb), pGK288 (de -288 a +76 pb), pGK72 (de -72 a +76 pb), pGK21 (de -21 a +76 pb) (tal com s'indica als apartats 2.2.9.A, 2.2.9.C i 2.2.9.D). Els plasmidis recombinants obtinguts, foren cotransfectats transitòriament en cèl·lules HepG2 amb un plasmidi (pCMV- β) que expressa *lacZ* (β -galactosidasa), utilitzat com a control intern de l'eficiència de la transfecció. L'anàlisi de l'activitat luciferasa dels constructes reporters que contenen els fragments del promotor de 1321, 606 i 288 pb revela una activació de l'ordre de 4-5 vegades (figura 20) respecte el control negatiu pGL3-Basic. Aquests resultats suggereixen que la regió corresponent als 1321 nucleòtids corrent amunt de l'extrem 5' respecte l'inici de transcripció de *GCK* de fetge d'orada conté un promotor funcional, i que el fragment de 288 pb sembla ser important per a l'activitat promotora basal. Quan les cèl·lules foren transfectades amb el constructe que contenia la seqüència compresa entre els pb -72 a +76 (pGK72), l'activitat promotora va decreixer aproximadament fins al 50%. No es va observar activitat promotora en el cas d'utilitzar el constructe més petit (pGK21; -21 a +76 pb) o en el cas de transfectar les cèl·lules amb el constructe que conté la regió compresa entre -606 pb i +76 pb en relació a l'inici de transcripció, però amb una delecció entre les posicions -288 a -21 (pGK606 Δ 288-21), constructe descrit a l'apartat 2.2.9.F. Aquests resultats indiquen que la regió promotora situada entre -288 pb i -21 pb és necessària per a la transcripció basal del gen que codifica per a *GCK* d'orada, i suggereix que elements reguladors en *cis* podrien estar localitzats en aquesta regió.



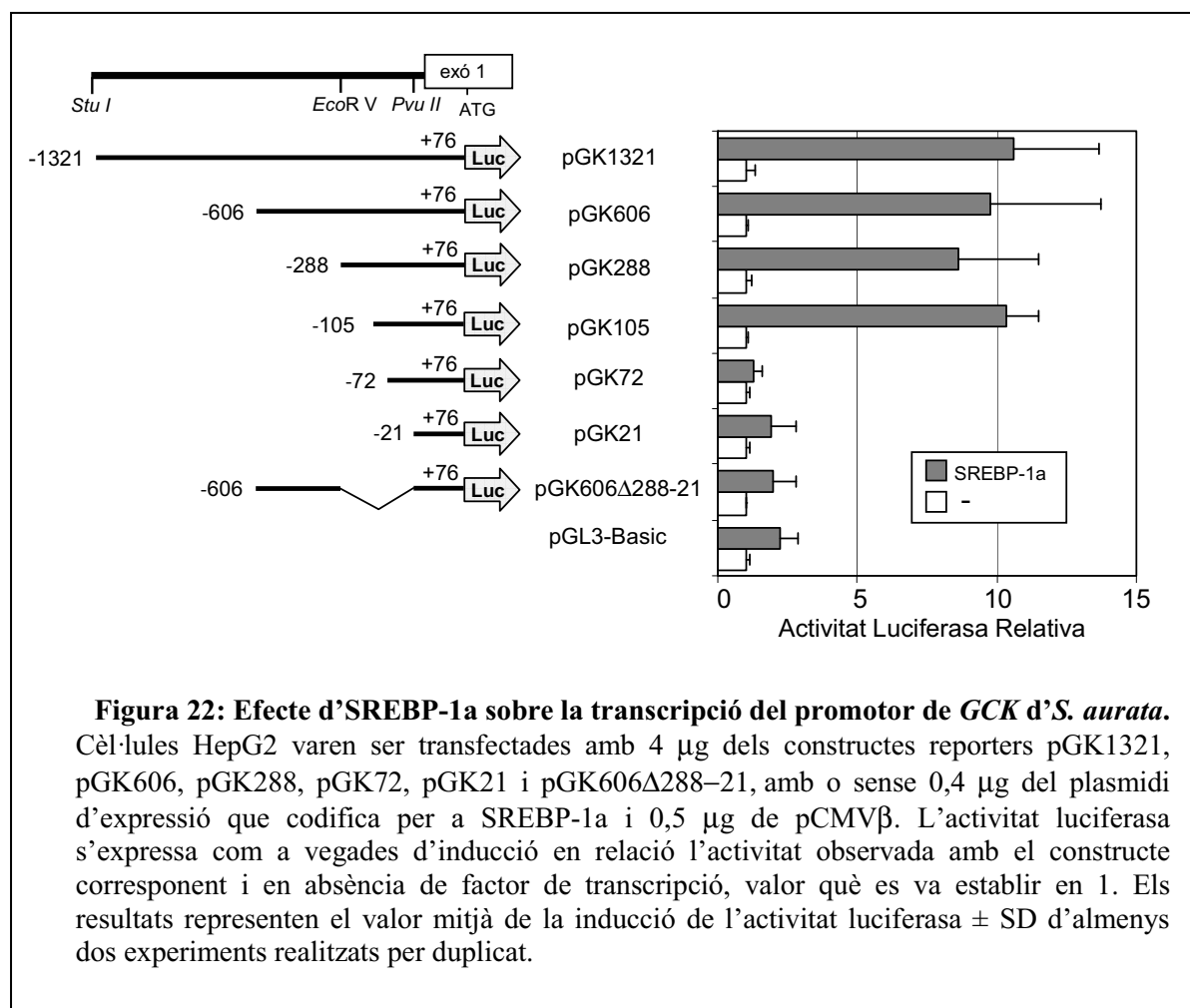
Per tal de testar l'activitat promotora en altres tipus cel·lulars es van realitzar experiments de transfecció en cèl·lules D11, derivades de fetge de truita. Aquestes cèl·lules en cultiu presenten creixement lent, baixa supervivència i baixa eficiència de transfecció. Es van dur a terme experiments de transfecció transitòria amb els constructes descrits prèviament (pGK1321, pGK606, pGK288, pGK72, pGK21, pGL3-Basic). L'anàlisi de l'activitat luciferasa va indicar que en cèl·lules D11 l'activitat basal del promotor és més elevada que en cèl·lules HepG2, encara que mostren les mateixes característiques generals (figura 21).



3.8 PAPER D'SREBP-1a EN LA REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DE GCK

3.8.1 ACTIVACIÓ DEL PROMOTOR DE GCK PER SREBP-1a

Les proteïnes SREBP pertanyen a la família *basic-helix-loop-helix* cremallera de leucines, i són codificades pels gens SREBP-1 i SREBP-2 (Hua i col·l, 1995; Miserez i col·l, 1997). SREBP-1a és un potent activador dels gens de resposta a SREBP i mostra una activitat transcripcional major que SREBP-1c en cultius cel·lulars (Pai i col·l, 1998) i en fetge (Shimano i col·l, 1997; Horton i col·l, 1998). S'ha descrit que SREBP-1a intervé en la regulació tant de gens implicats en el metabolisme de colesterol, com en la síntesi lipídica (Eberlé i col·l, 2004). El paper d'SREBP-1c i SREBP-2 sembla més restrictiu. SREBP-2 regula la transcripció de gens que controlen l'homeòstasi del colesterol, mentre que SREBP-1c participa en l'estimulació de gens implicats en la síntesi d'àcids grassos (Kim i col·l, 2004a, Shimomura i col·l, 1997). Així mateix, s'ha descrit que SREBP-1 regula la transcripció de gens implicats en el control de la glucòlisi/gluconeogènesi (Foretz i col·l, 1999a; Shimomura i col·l, 1999; Gosmain i col·l, 2004; Kim i col·l, 2004a; Yamamoto i col·l, 2004). Kim i col·l (2004a) assenyalen que SREBP-1c interacciona amb el promotor de la GCK hepàtica de rata actuant com a activador transcripcional.



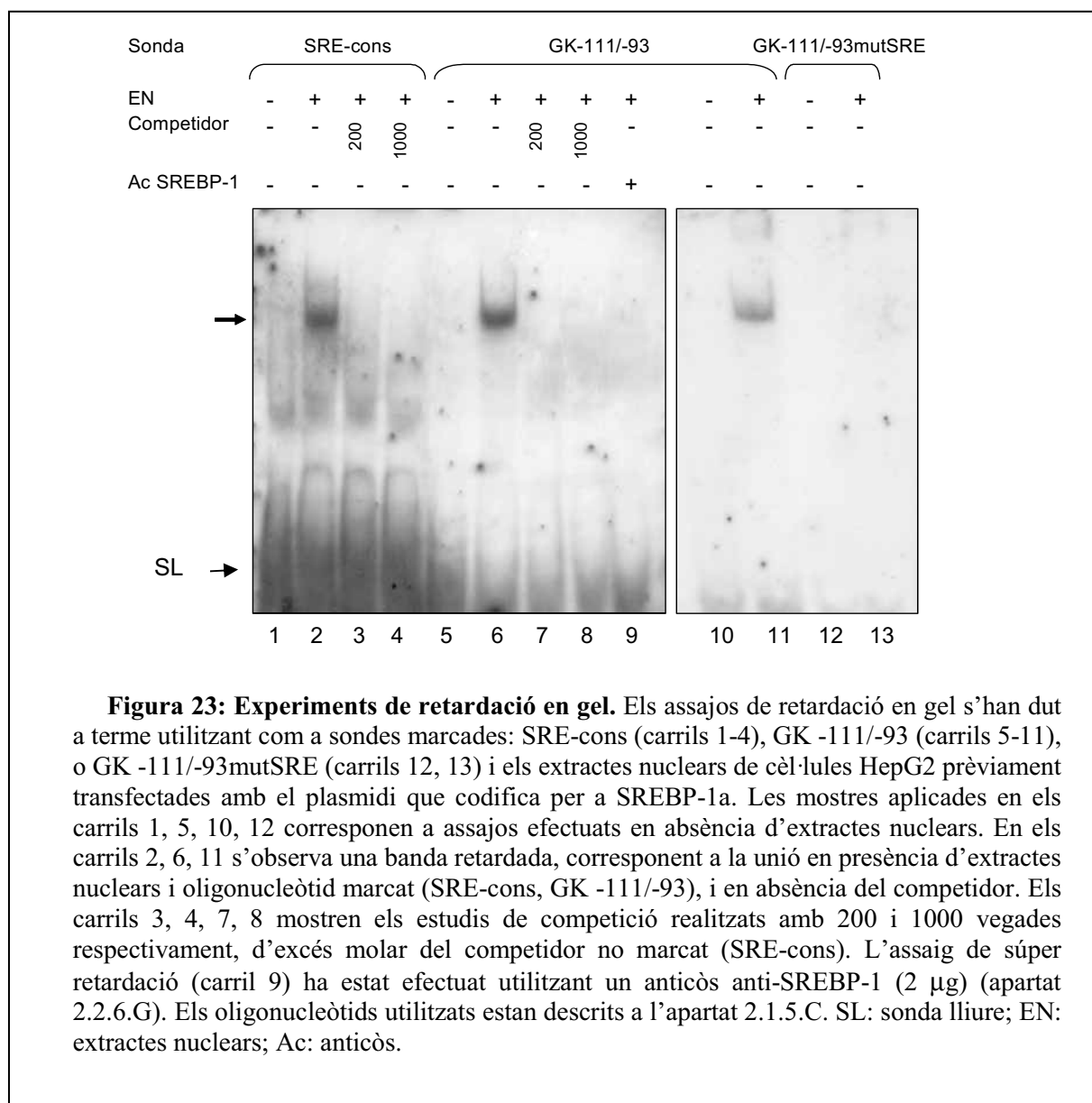
L'anàlisi de la seqüència del promotor de *GCK* d'orada ens va permetre localitzar dos possibles llocs d'unió per a SREBP-1 (SRE), entre les posicions -105/-95 i -39/-29, en relació a l'inici de transcripció. Per tal de conèixer la implicació d'aquest factor en la transcripció de la *GCK* varem efectuar assajos de cotransfecció transitòria en cèl·lules HepG2. Per a aquest fi es van utilitzar els constructes reporters que presentaven diferents delecions en l'extrem 5' del fragment del promotor, juntament amb el plasmidi d'expressió que codifica per a SREBP-1a. Quan es realitzaren els experiments de cotransfecció amb els constructes pGK21 i pGK72 no es va observar increment de l'activitat promotora. Fet que suggeria que la caixa -39/-29 en relació a l'inici de transcripció no estava implicada en l'activació per SREBP-1a, i que el lloc SRE funcional podria ser el localitzat entre -105/-95 en relació a l'inici de transcripció. La cotransfecció d'SREBP-1a amb els constructes reporters de mida igual o superior a pGK105 causava un increment de l'activitat promotora, en relació a l'activitat basal del corresponent constructe, de 9 a 11 vegades. Coherentment, no es va observar activació transcripcional per SREBP-1a quan es van cotransfectar les cèl·lules amb el constructe reporter pGK606Δ288-21, en què la regió compresa entre les posicions -288 a -21 es troba delecionada (figura 22). Aquests resultats permeten descartar la caixa SRE situada entre les posicions -39/-29 en

relació a l'inici de transcripció com a caixa implicada en l'activació transcripcional per SREBP-1a, i ens va conduir a estudiar la possible acció activadora d'SREBP-1a sobre la caixa SRE localitzada entre les posicions -105/-95 en relació a l'inici de transcripció.

3.8.2 SREBP-1a S'UNEIX A LA CAIXA SRE -105/-95

El constructe més petit que mostrà transactivació per SREBP-1a en els experiments de transfecció transitòria, fou pGK105. Aquest constructe conté la caixa SRE situada entre les posicions -105/-95 en relació a l'inici de transcripció. Per tal d'analitzar si SREBP-1a pot unir-se a aquesta caixa SRE es van realitzar assajos de retardació en gel (apartat 2.2.6). Per a tal fi s'utilitzaren extractes nuclears de cèl·lules HepG2, que sobreexpressen el factor SREBP-1a i una sonda que conté els nucleòtids compresos entre les posicions -111/-93 en relació a l'inici de transcripció del promotor de la *GCK* hepàtica d'orada. Aquesta seqüència nucleotídica conté l'hipotètic lloc d'unió a SREBP-1a (SRE) situat entre -105/-95 (figura 19). Després de la reacció, les mostres aplicades en el gel de poliacrilamida i la posterior electroforesi revelaren que el complex DNA-proteïna format en l'assaig generava una banda de mobilitat retardada (carril 6 de la figura 23). Com a control positiu es va utilitzar una sonda que contenia la regió consens d'unió a SREBP (SRE-cons), que donava lloc a una banda de la mateixa mobilitat (carril 2). Els carrils 1 i 5 corresponen a mostres incubades en absència d'extractes nuclears (figura 23).

A l'efectuar experiments de competició amb un excés molar de 200 i 1000 vegades amb la sonda SRE-cons no marcada (carrils 7 i 8 respectivament), la banda de mobilitat retardada desapareixia. Com a control positiu es va utilitzar la sonda SRE-cons, que mostrava la competició amb un excés molar de 200 i 1000 vegades (carrils 3 i 4 respectivament). Els assajos de retardació efectuats utilitzant extractes nuclears de cèl·lules que sobreexpressessin SREBP-1a i amb una sonda mutada en la regió SRE, GK-111/-93mutSRE, mostren que la banda retardada observada en utilitzar les sondes SREBP-cons i GK-111/-93, desapareix completament (carril 13, figura 23). Addicionalment, es van realitzar assajos de súper retardació utilitzant un anticòs anti-SREBP. La banda de mobilitat retardada produïda per la unió de la sonda GK -111/-93 i la proteïna SREBP-1a, present en els extractes nuclears, desapareix en presència de l'anticòs anti-SREBP-1 (carril 9, figura 23), fet que suggereix que la unió de l'anticòs a SREBP-1a bloqueja la unió d'aquest factor al lloc SRE present en la sonda. Aquests experiments indiquen que SREBP-1a s'uneix a la caixa SRE situada entre els pb -105/-95 en relació a l'inici de transcripció del promotor de la *GCK* hepàtica d'orada.

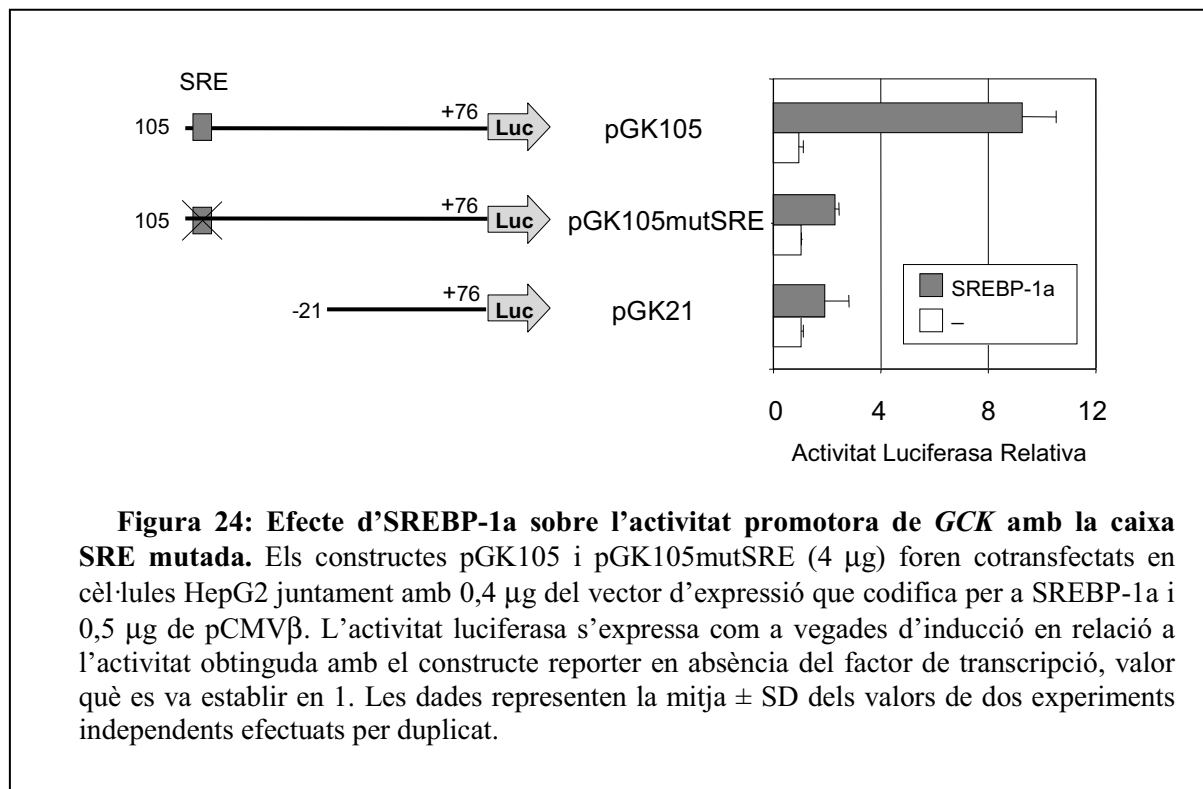


3.8.3 LA MUTACIÓ DE LA CAIXA SRE ELIMINA LA TRANSACTIVACIÓ PRODUÏDA PER SREBP-1a

A fi de caracteritzar l'efecte que produeix la mutació del lloc SRE en el promotor de la *GCK* vam obtenir el constructe reporter pGK105mutSRE. Aquest constructe conté el fragment de 105 pb amb les mateixes mutacions que presenta l'oligonucleòtid de doble cadena GK-111/-93mutSRE que vam utilitzar en els assajos de retardació. Es dugueren a terme experiments de cotransfecció en cèl·lules HepG2 utilitzant els constructes pGK105 i pGK105mutSRE i el vector d'expressió per a SREBP-1a. Tal com mostra la figura 24, SREBP-1a no és capaç de promoure activació transcripcional quan el lloc SRE està mutat. La

mutació de la caixa SRE situada entre els pb -105/-95 impedeix que es produeixi activació transcripcional per SREBP-1a.

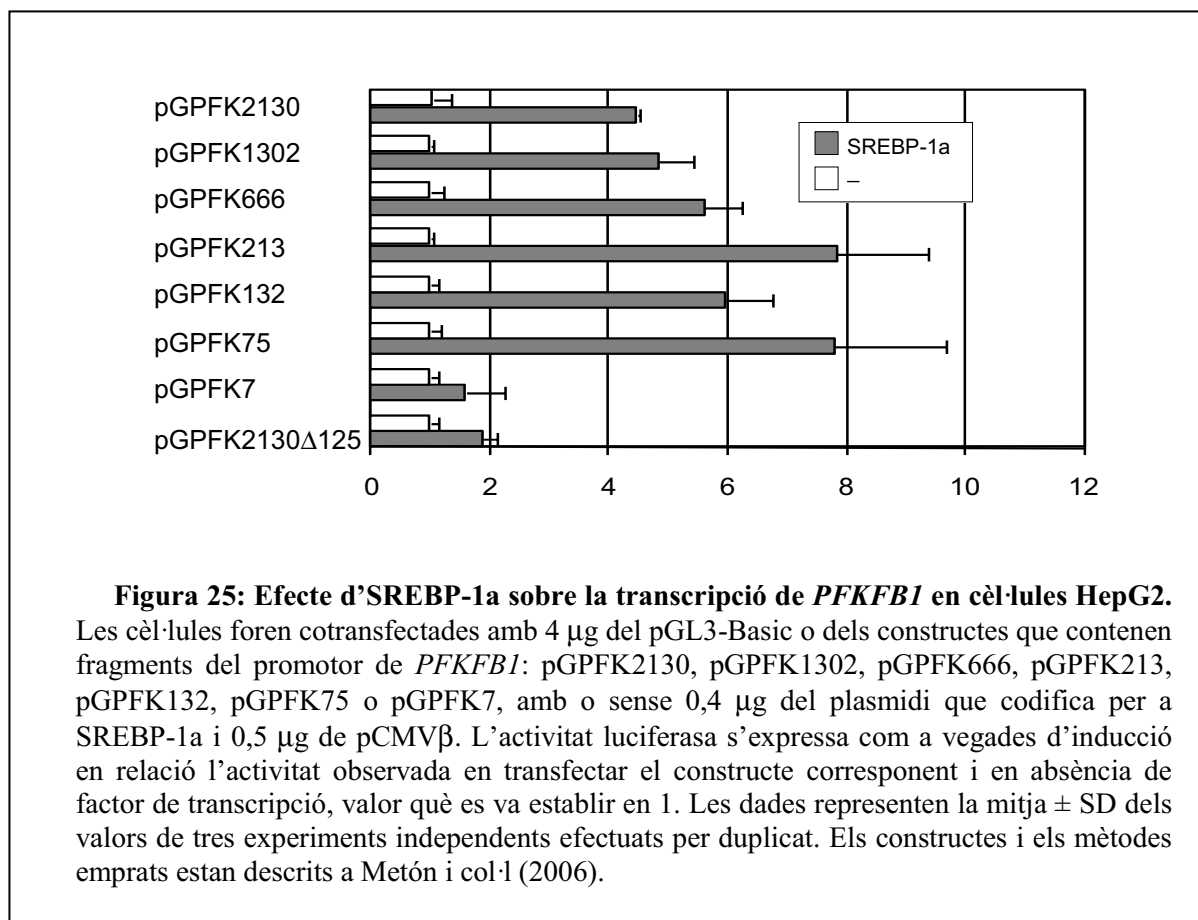
Aquests resultats indiquen que el lloc SRE situat a la entre els pb -105 i -95 en relació a l'inici de transcripció del promotor de *GCK* d'orada, és el responsable de la transactivació per SREBP1a.



3.9 EFECTE D'SREBP-1a SOBRE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DE *PFKFB1* D'ORADA

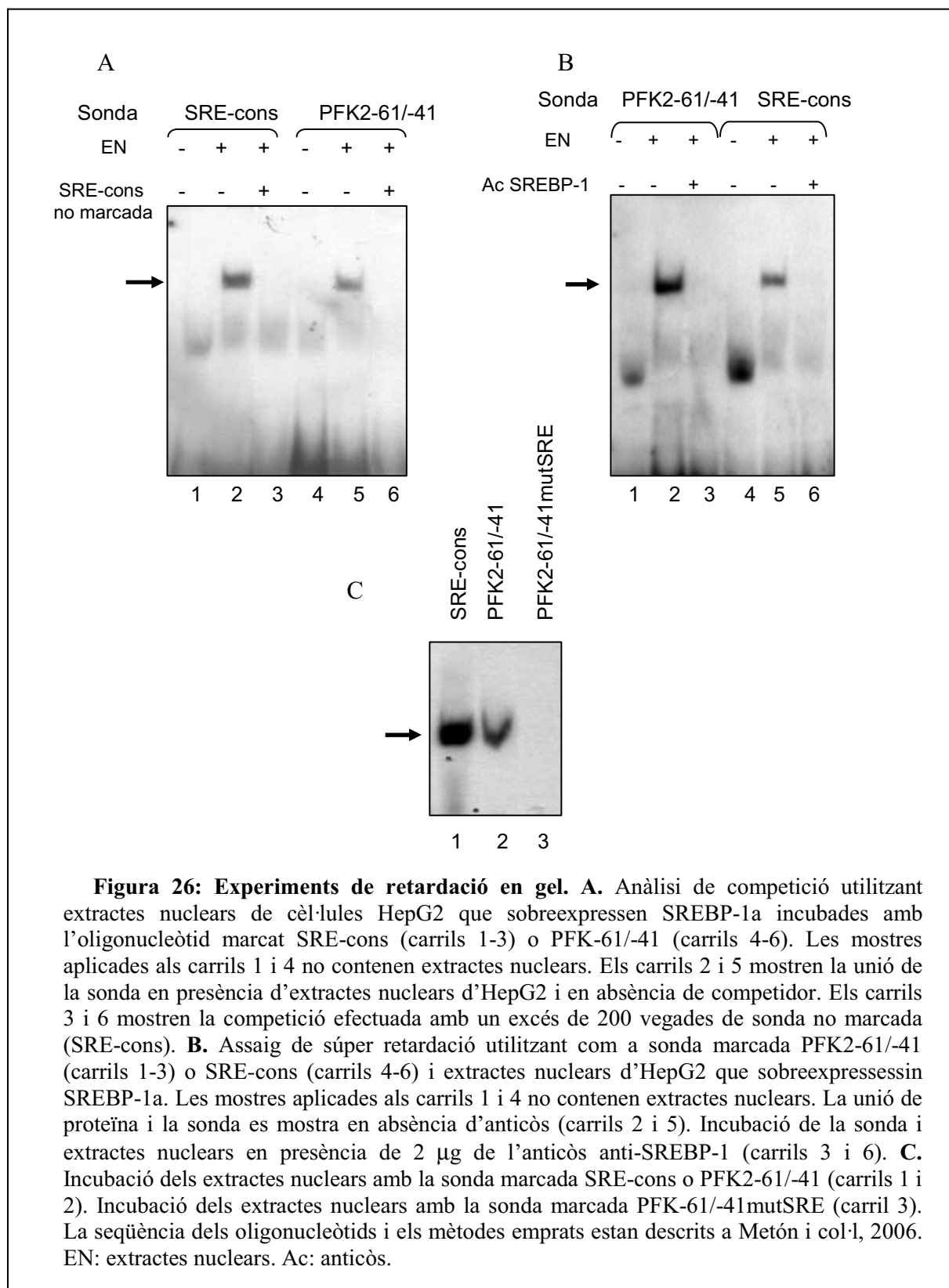
Recentment, s'ha clonat en el nostre laboratori el promotor del gen que codifica per a la *PFKFB1* d'orada. L'enzim PFKFB1 catalitza la síntesi i degradació hepàtica de fru-2,6P₂, que és un potent activador al·lostèric de PFK i inhibidor de FBP. La PFKFB1 és, per tant, un enzim clau en la regulació de la glucòlisi/gluconeogènesi i té un paper important en l'homeòstasi de la glucosa. En analitzar la seqüència del promotor de *PFKFB1* (número d'accés en el DDBJ/EMBL/GeneBank: AY2065001) vam observar la presència de dues caixes SRE situades entre les posicions -171/-163 i -56/-48. Coneixent que SREBP-1a exerceix un paper regulador en el control transcripcional de la *GCK* d'orada, i que estudis recents impliquen a SREBP-1 en la regulació del metabolisme glucídic (Gosmain i col·l, 2005), vam procedir a analitzar el paper d'SREBP-1a sobre l'activitat transcripcional de *PFKFB1* en orada. Varem cotransfectar cèl·lules HepG2 amb constructes reporters que contenien delecions seqüencials de l'extrem 5' de *PFKFB1*, juntament amb el plasmidi

d'expressió per a SREBP-1a. Tal com podem observar en la figura 25, SREBP-1a promou un increment de l'activitat promotora sobre els constructes que contenen com a mínim el fragment del promotor situat entre els pb -75 i +66 en relació a l'inici de transcripció. Els resultats obtinguts van permetre descartar la caixa SRE situada entre els nucleòtids -171/ -163 en la regulació de *PFKFB1* per SREBP-1a, i donat que el constructe més petit que mostra transactivació mitjançada per SREBP-1a (pGPFK75; posicions -75 a +66 en relació a l'inici de transcripció) conté una caixa SRE situada entre les posicions -56/-48, ens vam centrar en estudiar la unió d'SREBP-1a a aquesta caixa (figura 25).



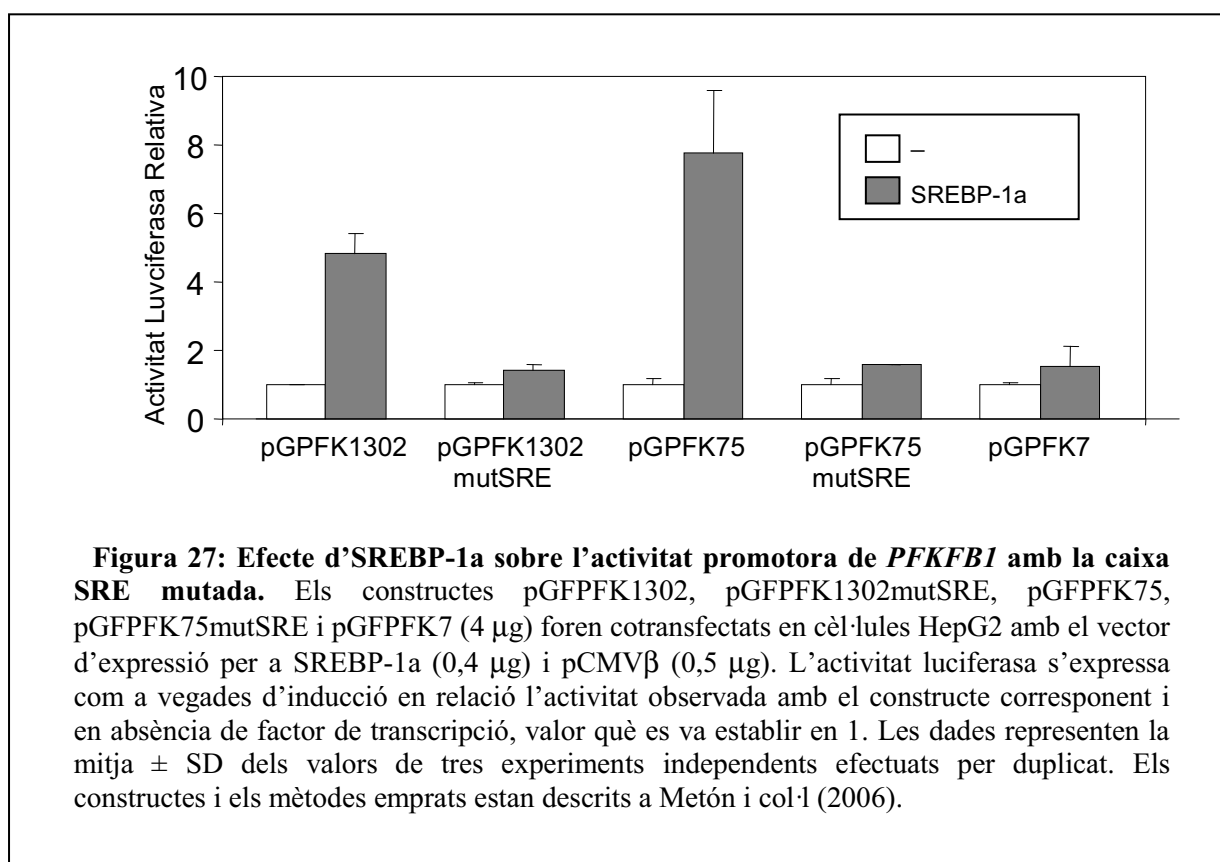
Mitjançant experiments de retardació en gel vam observar la formació d'una banda retardada (carril 2 de la figura 26 A) que correspon a la unió d'SREBP-1a a l'oligonucleòtid que conté el lloc SRE situat entre els pb -56/-48 en relació a l'inici de transcripció de *PFKFB1*. A fi d'estudiar la unió entre SREBP-1 i el lloc SRE esmentat es van dur a terme assajos de competició i de súper retardació. La incubació amb un excés de la sonda no marcada de 200 molar produïa la desaparició de la banda retardada (carril 3 i 6, figura 26 A). Així mateix, la incubació de l'oligonucleòtid marcat i d'extractes nuclears que sobreexpressessin SREBP-1a en presència d'anticòs anti-SREBP (carril 3 i 6 figura 26 B), provocava el bloqueig de la unió d'SREBP-1a al lloc SRE, i conduïa a la desaparició de la

banda retardada. Aquests experiments indiquen que SREBP-1a s'uneix a la caixa SRE situada en -56 a -48 en relació a l'inici de transcripció.



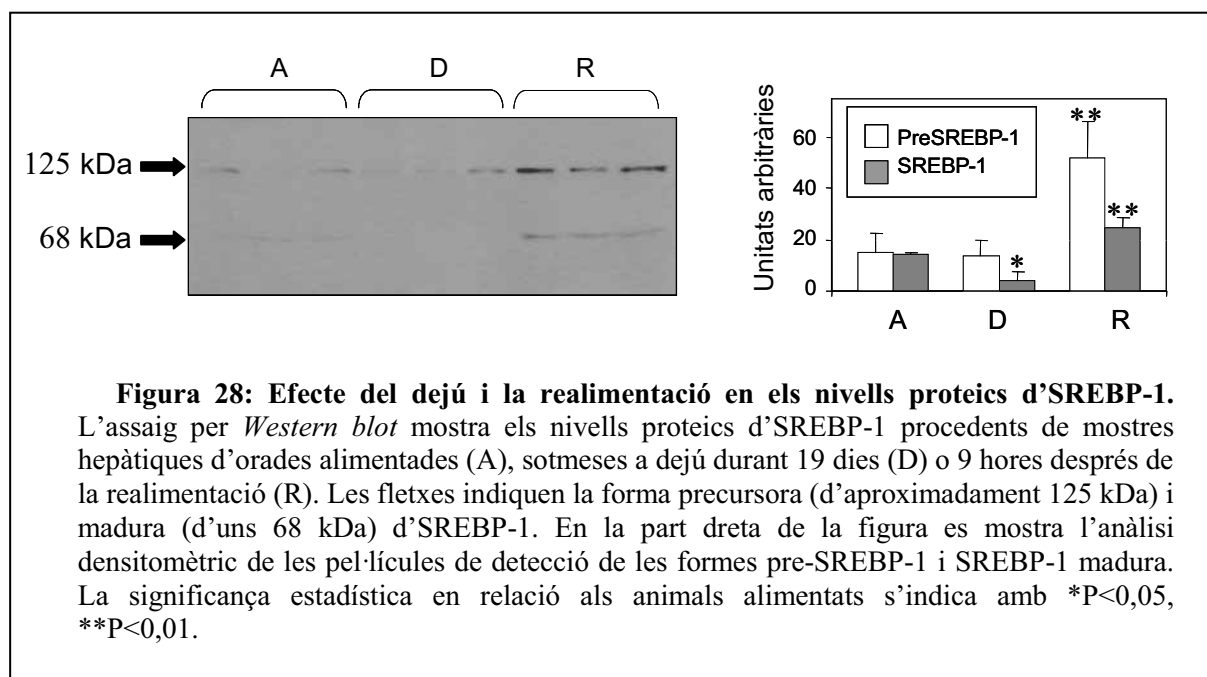
Per tal d'examinar si mutacions en aquesta caixa SRE podrien afectar a l'activació del promotor de *PFKFB1*, es van dur a terme assajos de retardació en gel utilitzant extractes nuclears d'HepG2 que sobreexpressessin SREBP-1a i la sonda marcada que conté el lloc SRE mutat (PFK-61/-41mutSRE). Tal com es mostra en la figura 26 C, el complex DNA-proteïna retardat format quan s'utilitzen les sondes SRE-cons i PFK2-61/-41 (posicions -61 a -41 en relació a l'inici de transcripció) desapareix quan s'utilitza la sonda mutada (PFK-61/-41mutSRE).

La funcionalitat que exerceix la caixa SRE, localitzada en les posicions -56 a -48, es va analitzar mitjançant experiments de transfecció transitòria de cèl·lules HepG2. Per a aquest fi, es van utilitzar els constructes reporters de *PFKFB1* (pGFPFK1302mutSRE i pGFPFK75mutSRE) que presenten les mateixes mutacions emprades en l'oligonucleòtid de doble cadena PFK-61/-41mutSRE, que va ser utilitzat en els assajos de retardació en gel. Tal com mostra la figura 27, SREBP-1a promou l'increment de la transcripció de pGFPFK75, però no és capaç de promoure l'activació transcripcional dels constructes que contenen la caixa SRE mutada. Aquests resultats indiquen que la caixa SRE situada entre les posicions -56 i -48 en relació a l'inici de transcripció és la responsable de l'activació del promotor de *PFKFB1* d'orada per SREBP-1a.



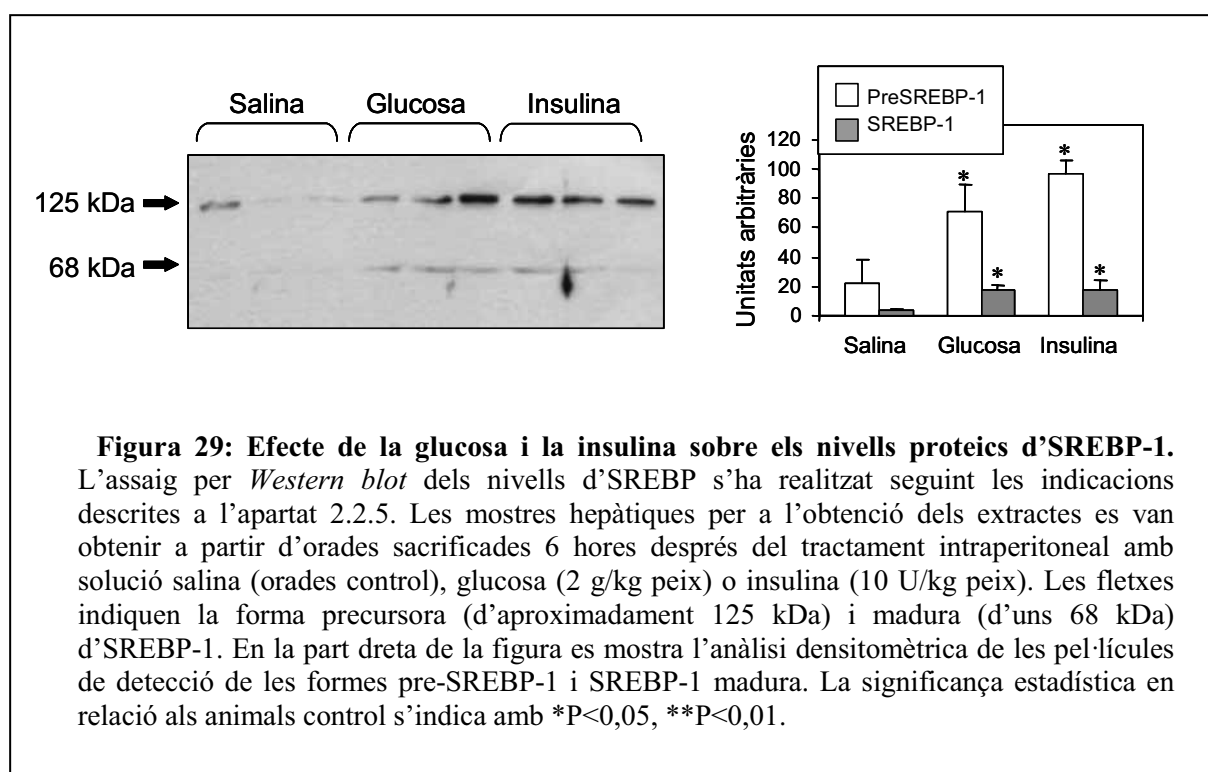
3.10 REGULACIÓ HORMONAL I NUTRICIONAL D'SREBP-1

Una vegada observada l'activació pel factor de transcripció d'SREBP-1a de dos gens clau implicats en la glucòlisi/gluconeogènesi, *GCK* i *PFKFB1*, ens vam proposar conèixer si l'expressió d'aquest factor de transcripció en fetge d'orades estava regulada per condicions nutricionals i hormonals. Per a aquesta finalitat es van analitzar els nivells de proteïna SREBP-1 en peixos dejunats durant 19 dies i en els posteriorment realimentats durant 9 hores (apartat 2.1.1.A.1). Així mateix, es va analitzar l'expressió d'SREBP-1 en extractes hepàtics d'orades tractades amb insulina o amb glucosa (apartat 2.1.1.A.2). L'anàlisi per *Western blot* utilitzant anticossos contra SREBP-1 mostra que en dejú, la forma madura d'SREBP-1 (68kDa) pràcticament no es detecta en fetge d'orades (figura 28). En mostres hepàtiques recollides després de 9 hores de realimentació s'observa un increment tant a nivell del precursor de la proteïna (125 KDa) com de la forma madura (figura 28) respecte als nivells observats en orades alimentades o dejunades. Estudis previs indiquen que, en fetge de ratolins, l'expressió tant d'SREBP-1a com d'SREBP-1c està regulada per dejú i realimentació (Liang i col·l, 2002; Zhang i col·l, 2005), de manera similar als resultats observats en l'orada.



En relació a la regulació de l'expressió d'SREBP-1 en fetge d'orades tractades amb insulina o glucosa, observem un increment dels nivells d'expressió d'SREBP-1 sis hores després del tractament amb insulina o glucosa respecte les orades tractades amb solució salina. L'augment dels nivells proteics d'SREBP-1 s'observa tant a nivell de la forma precursora, com de la forma madura (figura 29). En mamífers també s'ha descrit que la insulina promou la transcripció del gen SREBP-1 tant a nivell de la forma precursora com de

la forma madura (Shimomura i col·l, 1999; Foretz i col·l, 1999a; Azzout-Marniche i col·l, 2000). Així mateix, Hasty i col·l (2000) descriuen que la glucosa indueix l'expressió d'SREBP-1 de forma dependent de la dosi. Recentment, alguns autors assenyalen que l'exposició a altes concentracions de glucosa condueix a un increment de la forma madura d'SREBP-1, suggerint que la glucosa estimula el processament d'SREBP-1 (Sandberg i col·l, 2005).



3.11 PAPER D'Sp1 I Sp3 EN LA REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE GCK D'ORADA

3.11.1 TRANSACTIVACIÓ DEL PROMOTOR DE GCK PER Sp1 I REPRESSIÓ PER Sp3 DE L'ACTIVACIÓ PRODUÏDA PER Sp1

Sp1 i Sp3 pertanyen a la família de proteïnes Sp, les quals a través de la unió a caixes GC/GT regulen l'expressió de gens diana (Hagen i col·l, 1992; Kingsley i Winoto, 1992; Harrison i col·l, 2000; Scohy i col·l, 2000; Bouwman i Philipsen, 2002; Nakashima i col·l, 2002). S'ha descrit que Sp1 participa en la regulació transcripcional d'alguns enzims implicats en el metabolisme glucídic (Hermfisse i col·l, 1996; Schafer i col·l, 1996; Netzker i col·l, 1997; Gosmain i col·l, 2005). D'altra banda, es coneix que Sp3 pot actuar com a activador o repressor de l'efecte mitjançat per Sp1, dependent del promotor i del context cel·lular (Suske G., 1999; Bowman & Philipsen 2002; Kaczynski i col·l, 2003).

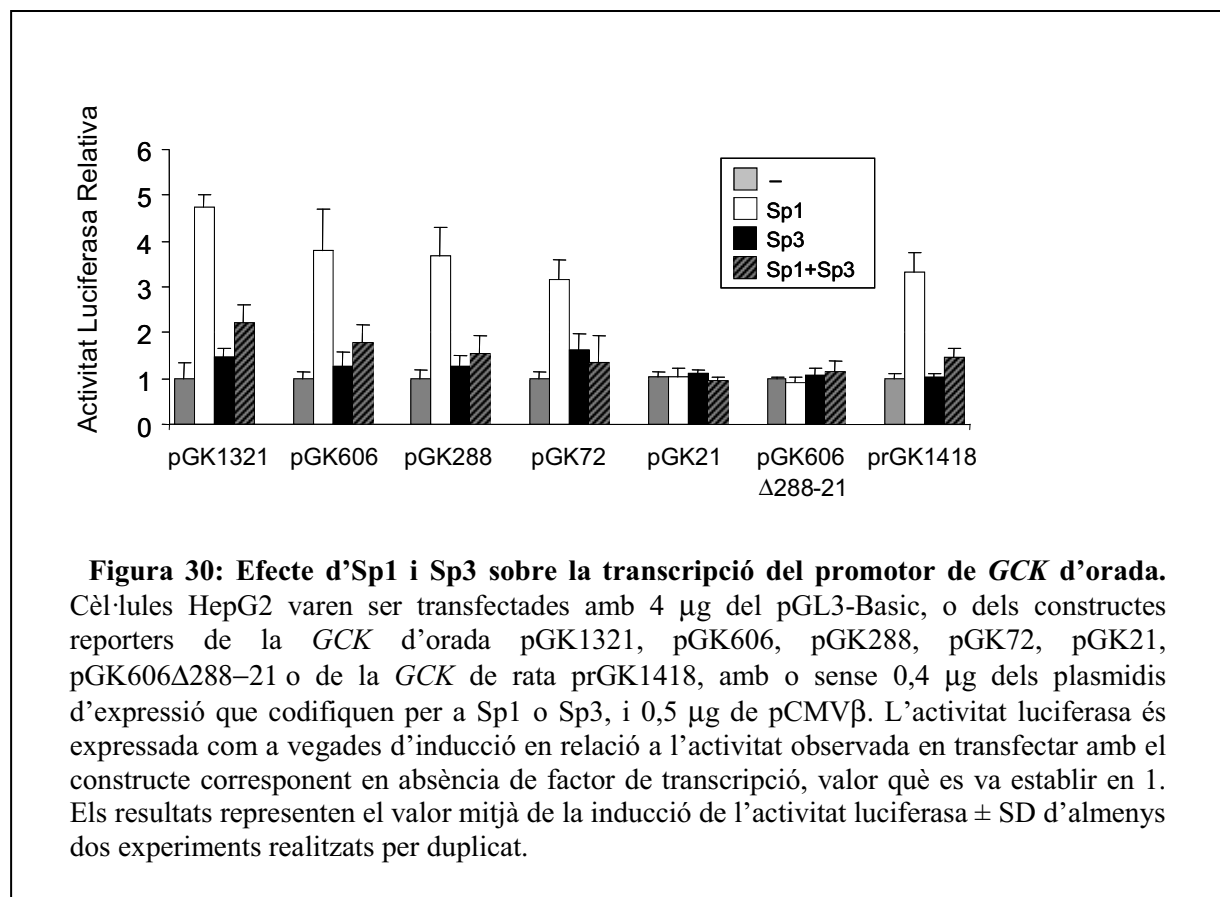
L'elevat contingut de GC i GT en la regió proximal del promotor de GCK hepàtica d'orada ens va portar a investigar el possible paper de les proteïnes Sp en l'activació transcripcional de la GCK de fetge d'orada. Per a aquest fi es van dur a terme experiments de cotransfecció transitòria en cèl·lules HepG2. Constructes reporters, que contenen les seqüències de l'extrem 5' del promotor de la GCK hepàtica d'orada diferentment deleccionades, foren transfectats en cèl·lules HepG2 juntament amb plasmidis d'expressió que codifiquen per a membres de la família Sp, com Sp1 o Sp3. La cotransfecció d'Sp1 amb diferents constructes reporters de mida igual o superior a pGK72 (pGK72, pGK288, pGK606, pGK1321) va donar lloc a una inducció de 3 a 5 vegades de l'activitat promotora en relació a l'activitat basal del corresponent constructe. D'altra banda, no es detectava increment en l'activitat promotora quan s'utilitzava el constructe més petit, pGK21. Quan es van cotransfectar cèl·lules amb el constructe reporter pGK606Δ288-21, en què manca la regió compresa entre les posicions -288 a -21, no es va observar activació transcripcional per Sp1. Els resultats obtinguts suggerien que un lloc Sp1 funcional podria estar localitzat en els 72 pb en relació a l'origen de transcripció, adjacents a l'extrem 5' del cDNA que codifica per a la GCK de fetge d'orada, ja que el constructe més petit activat per Sp1 era el pGK72. Estudis informàtics revelen en la regió de 72 pb, la presència d'un lloc d'unió a Sp entre els nucleòtids -53 a -44 en relació a l'inici de transcripció.

Els factors Sp1 i Sp3 poden competir pel mateix lloc d'unió, tot i que tenen un comportament funcional diferent (Hagen i col·l, 1994; Suske G., 1999). Per estudiar l'efecte d'Sp1 i Sp3 sobre l'activitat transcripcional GCK, es van cotransfectar plasmidis d'expressió per a Sp1 i Sp3 amb els constructes reporters en les cèl·lules HepG2. La cotransfecció amb el plasmidi que codifica per a Sp3 va mostrar que aquest no exerceix cap efecte modulador per si sol sobre l'activitat promotora de GCK (figura 30). D'altra banda, la cotransfecció d'una mescla en proporció 1:1 dels vectors d'expressió per a Sp1 i Sp3 resulta en la inhibició de la transactivació depenent d'Sp1. Aquesta inhibició es va observar en la transfecció amb els diferents constructes que contenen un fragment del promotor més gran de 72 pb (pGK72, pGK288, pGK606, pGK1321).

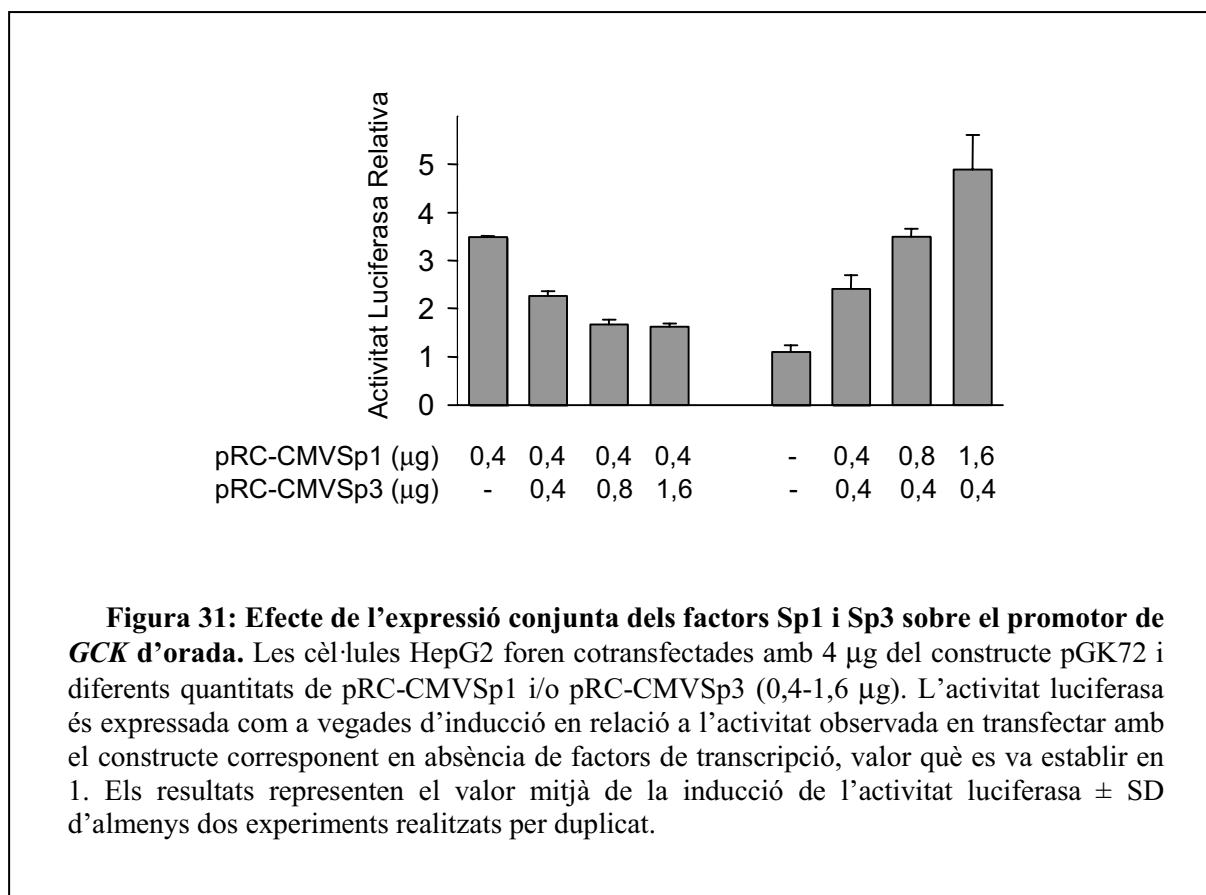
S'ha descrit que el promotor de GCK de rata i ratolí conté un lloc d'unió a Sp1, tot i que no ha estat demostrat el seu possible paper com a activador (Magnuson i col·l, 1989a; Postic i col·l, 1995; Samson i Wong, 2002). A fi d'estudiar si el paper d'Sp1 sobre la regulació transcripcional de GCK d'orada és específic de peixos o es un efecte generalitzat en altres animals, vam dur a terme el clonatge del promotor de GCK de rata en el plasmidi pGL3Basic (apartat 2.2.9.G). Una vegada obtingut el constructe prGK1418 que conté el promotor de la GCK de rata (posicions -1418 a +109 pb respecte l'inici de transcripció) vam efectuar experiments de transfecció transitòria. El constructe obtingut inclou el possible lloc d'unió per a Sp1, localitzat entre les posicions -441 a -443 en relació a l'inici de transcripció de GCK hepàtica de rata (Magnuson i col·l, 1989a).

La transfecció de cèl·lules HepG2 amb el constructe prGK1418 i el plasmidi d'expressió per a Sp1, ens va permetre observar que Sp1 produeix una activació de l'activitat promotora

de *GCK* de rata. És més, com en el cas del promotor de *GCK* d'orada, els experiments de cotransfecció de les cèl·lules amb prGK1418, i els plasmidis d'expressió per a Sp1 i Sp3, indicaven que Sp3 també exerceix un efecte repressor sobre l'efecte activador d'Sp1.



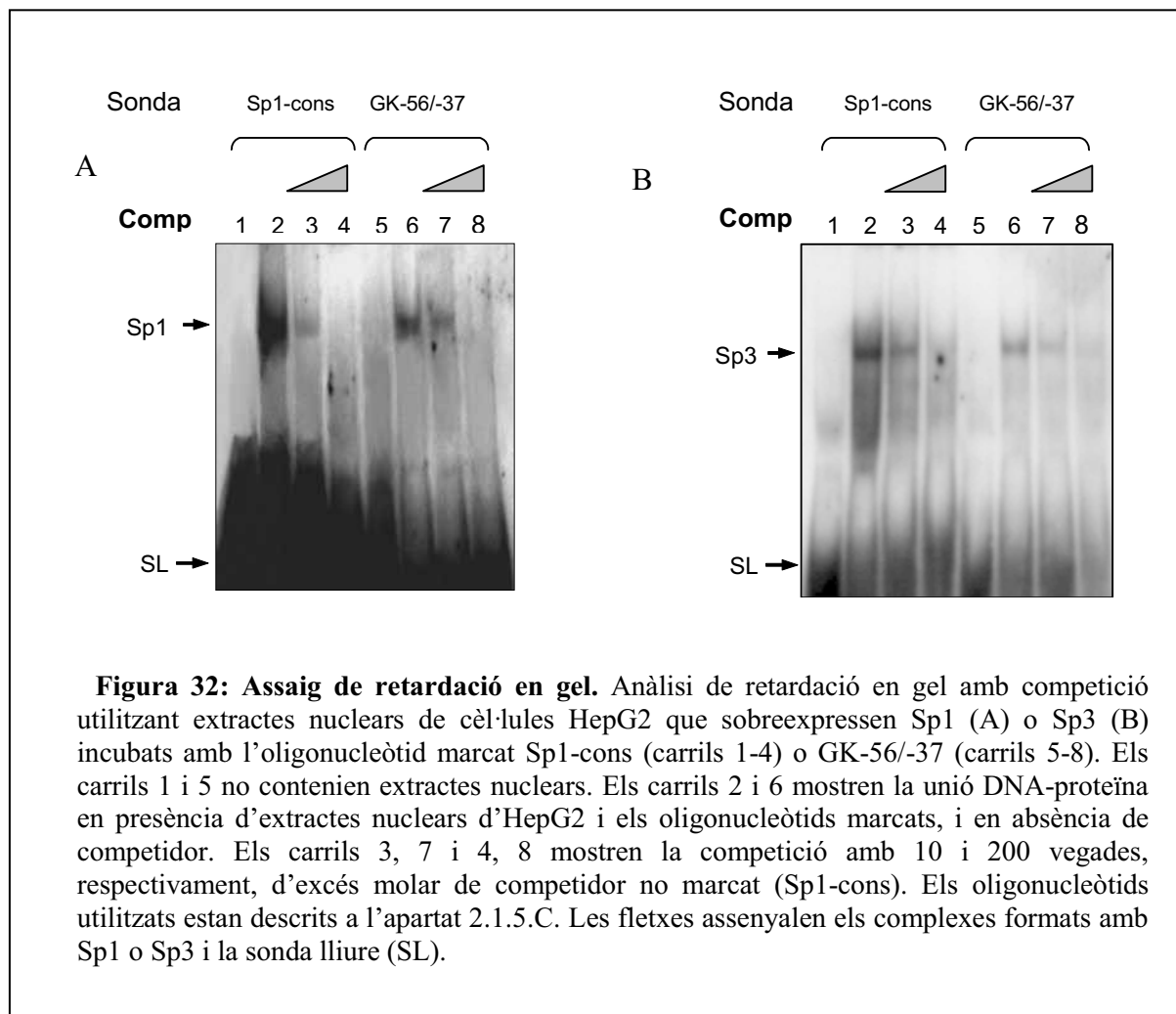
Per investigar la funció potencial d'Sp3 sobre el promotor de *GCK* d'orada, diferents quantitats (de 0,4 a 1,6 µg) dels vectors d'expressió que codifiquen per a Sp1 i Sp3 es van cotransfectar en cèl·lules HepG2 juntament amb el constructe pGK72. L'anàlisi de l'activitat luciferasa mostra que Sp3 exerceix un efecte inhibidor que és dependent de la quantitat d'Sp3 addicionada. Quan les cèl·lules són cotransfectades amb 0,4 µg de pRC-CMVSp1 i quantitats creixents de pRC-CMVSp3 l'efecte repressor d'Sp3 sobre Sp1 incrementa. Mentre que la transfecció amb 0,4 µg de pRC-CMVSp3 i quantitats creixents de pRC-CMVSp1 condueix a la reversió gradual de l'efecte produït per Sp1 (figura 31). Aquests resultats suggereixen que Sp1 i Sp3 competeixen pel mateix lloc d'unió al promotor de *GCK* hepàtica d'orada.



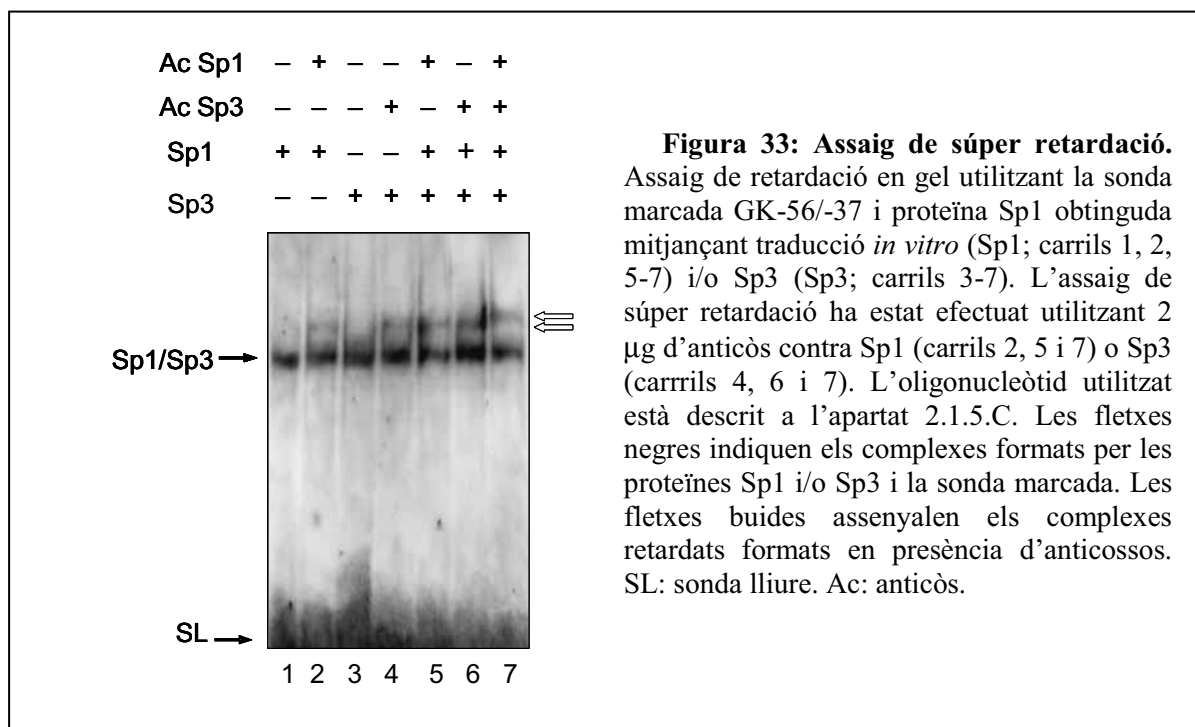
3.11.2 Sp1 I Sp3 S'UNEIXEN *IN VITRO* I *IN VIVO* A LA CAIXA GC -53/44

El constructe reporter més petit en què observàrem activació transcripcional de *GCK* d'orada per Sp1 en experiments de transfecció transitòria fou pGK72. En aquest constructe, el fragment del promotor clonat conté una regió rica en GC entre les posicions -53 a -44 en relació a l'inici de transcripció. Per tal d'analitzar si Sp1 i Sp3 poden unir-se al suposat lloc d'unió per Sp localitzat entre les posicions -53 to -44, es van dur a terme experiments de retardació en gel (apartat 2.2.6). Per a aquest estudi, es va utilitzar una sonda que contenia els nucleòtids compresos entre les posicions -56 i -37 del promotor de *GCK* d'orada (descrita a apartat 2.1.5.C), i extractes nuclears de cèl·lules HepG2, en què s'havia sobreexpressat el factor Sp1. Després d'incubar la sonda amb els extractes nuclears i d'efectuar l'electroforesi es va observar una banda de mobilitat retardada (figura 32 A, carril 6). Un complex DNA-proteïna de la mateixa mobilitat que l'esmentada anteriorment es va observar quan s'utilitzava una sonda corresponent a la zona consens d'unió a Sp1 (Sp1-cons) (carril 2). Per tal de confirmar la unió d'Sp1 a l'oligonucleòtid amb el lloc Sp es van dur a terme experiments de competició amb un excés de sonda no marcada de 10 i 200 molar. Els experiments de competició realitzats mostraven que la banda retardada desapareixia parcialment en incubar amb un excés de 10 molar de sonda Sp1-cons no marcada (carrils 3 i 7), i desapareixia totalment per competició amb un excés de 200 vegades de sonda Sp1-cons no marcada

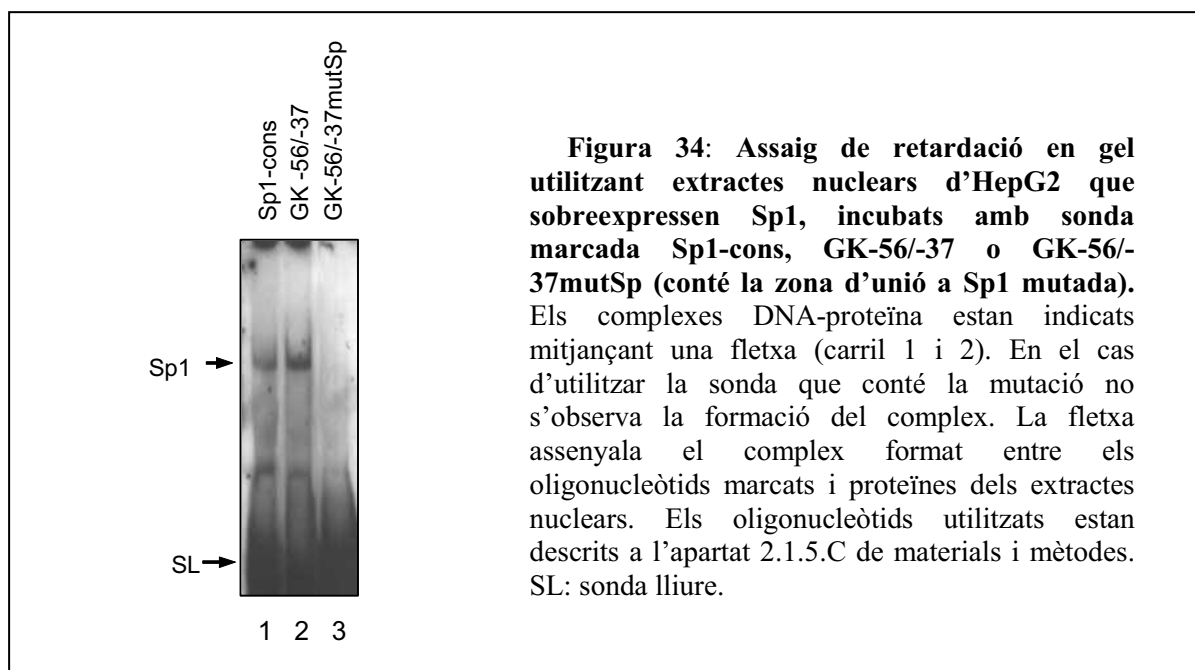
(carrils 4 i 8). Resultats similars foren obtinguts utilitzant extractes d'HepG2 a partir de cèl·lules en les que s'havia sobreexpressat Sp3 (figura 32 B). Aquestes dades indiquen que tant Sp1 com Sp3 s'uneixen a la caixa Sp localitzada entre les posicions Sp3 -53 i -44 del gen que codifica per a la *GCK* d'orada.



Per confirmar la unió de les proteïnes Sp1 i Sp3 a la regió situada entre els pb -53 a -44 del promotor de *GCK* d'orada varem realitzar un assaig de súper retardació (apartat 2.2.6.G). Es van utilitzar proteïnes Sp1 i Sp3, obtingudes mitjançant transcripció/traducció *in vitro*, i anticossos contra aquestes. Una vegada efectuada l'electroforesi de les mostres vam observar que la incubació de la sonda marcada GK-56/-37 amb la proteïna Sp1 obtinguda per traducció *in vitro* donava lloc a l'aparició d'una banda retardada (carril 1 de la figura 33). Una banda addicional de menor mobilitat apareixia com a conseqüència de la presència de l'anticòs Sp1 (carrils 2 i 5). Així mateix, s'obtingueren resultats similars en utilitzar l'anticòs anti-Sp3 en presència de proteïna Sp3 i sonda GK-56/-37 marcada (carrils 3, 4 i 6). Una banda de mobilitat encara més retardada fou observada en utilitzar ambdós anticossos, anti-Sp1 i anti-Sp3 (carril 7).



Els assajos retardació en gel utilitzant una sonda marcada que conté mutacions en la caixa GC del gen *GCK* (GK-56/-37mutSp) ens van permetre estudiar l'efecte de la mutació del lloc d'unió en la formació del complex DNA-proteïna. L'assaig de retardació emprant aquesta sonda i extractes nuclears de cèl·lules que sobreexpressessin Sp1 (figura 34) mostra que la banda retardada, prèviament observada en el cas d'utilitzar les sondes Sp1-cons i GK-56/-37, desapareixia completament quan s'utilitzava la sonda GK-56/-37mutSp.



Amb la finalitat d'estudiar si la interacció observada *in vitro* es produïa també *in vivo* es van dur a terme assajos d'immunoprecipitació de cromatina (apartat 2.2.7). Aquests experiments ens van permetre investigar l'associació *in vivo* d'Sp1 i Sp3 amb el promotor del gen que codifica per a la GCK. Una vegada efectuat l'entrecreuament entre la cromatina de fetge d'orada i factors proteics lligats al DNA, la cromatina es va fragmentar per sonicació. Els complexos DNA-proteïna s'immunoprecipitaren amb anticossos contra Sp1 o Sp3, o s'incubaren en absència d'anticòs (control negatiu). L'anàlisi mitjançant PCR amb nucleòtids que amplifiquen la regió compresa entre els nucleòtids -72 i +78 en relació a l'inici de transcripció, regió que comprèn el lloc d'unió a Sp (-53 to -44), mostrava que *in vivo* tant Sp1 com Sp3 tenen la capacitat d'associar-se al promotor de *GCK* (figura 35). Tal com era d'esperar no es va observar unió en absència d'anticòs. Aquests resultats indiquen que la caixa Sp existent entre les posicions -53 a -44 del promotor de *GCK* és un lloc d'unió per a Sp1 i Sp3 *in vivo*.

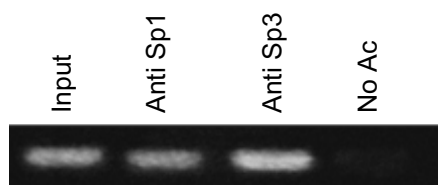
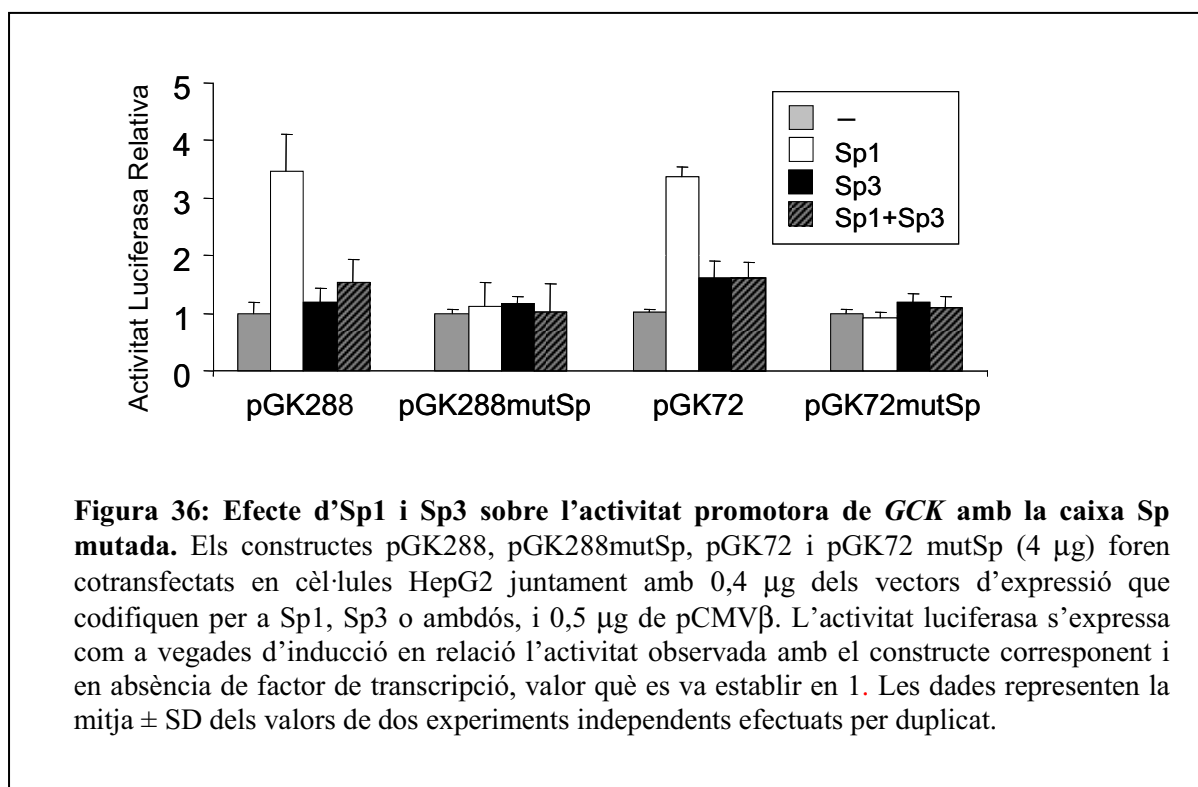


Figura 35: Associació d'Sp1 i Sp3 amb el promotor de *GCK in vivo*. L'assaig d'immunoprecipitació de cromatina es va realitzar a partir de cromatina aïllada de fetge d'orada. Una vegada efectuat l'entrecreuament amb formaldehid a l'1%, la cromatina fou fragmentada per sonicació, i immunoprecipitada amb anticossos anti-Sp1 i anti-Sp3 o en absència d'anticòs. Els immunocomplexos foren recollits amb proteïna A/G. Una vegada efectuats una sèrie de rentats, els complexos de proteïna foren eluïts i l'entrecreuament fou revertit. El DNA purificat es va analitzar per PCR utilitzant els oligonucleòtids: ME0004 i ME0202, que amplifiquen específicament els nucleòtids -72/+78 en relació a l'inici de transcripció del promotor del gen que codifica per a la GCK. Els productes de PCR foren sotmesos a electroforesi en gel d'agarosa i visualitzats amb llum ultraviolada.

3.11.3 LA MUTACIÓ DEL LLOC D'UNIÓ D'Sp ELIMINA LA TRANSACTIVACIÓ PRODUÏDA PER Sp1

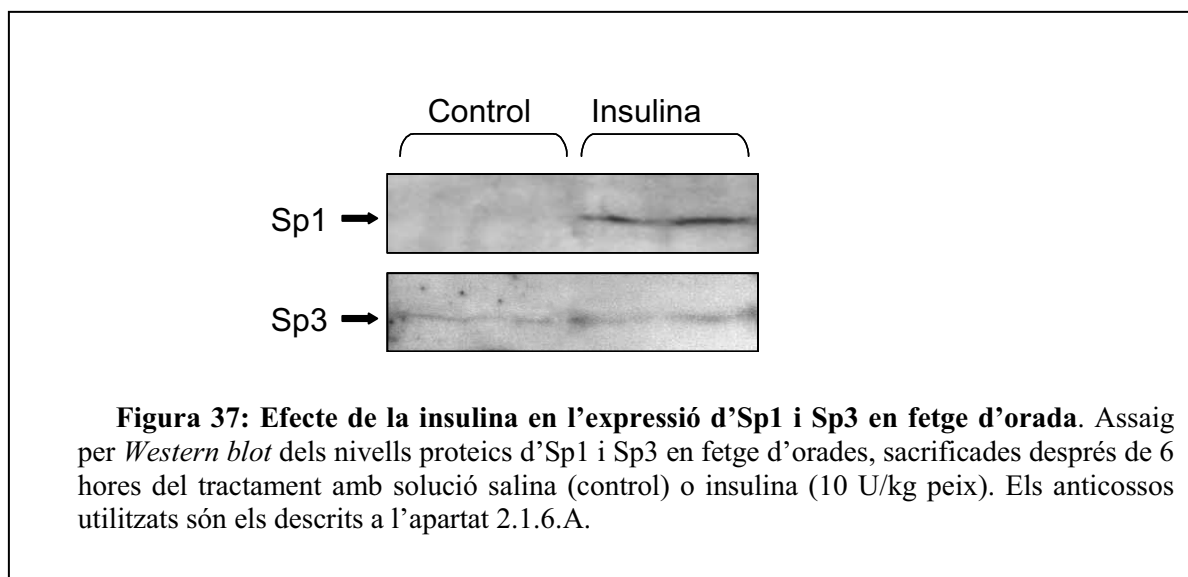
Les mateixes mutacions descrites en l'oligonucleòtid de doble cadena GK-56/-37mutSp, utilitzat en els assajos de retardació, foren introduïdes en els constructes reporters pGK288 i pGK72 amb la finalitat de generar constructes que continguessin el lloc Sp mutat (pGK288mutSp i pGK72mutSp). Per tal de comparar la transactivació observada amb els constructes reporters salvatges en relació als constructes mutats, es dugueren a terme experiments de cotransfecció en cèl·lules HepG2 utilitzant els quatre constructes (pGK288, pGK288mutSp, pGK72, i pGK72mutSp) i els vectors d'expressió per a Sp1 i Sp3. Tal com es mostra en la figura 36, Sp1 no és capaç de promoure l'activació dels constructes que contenen el lloc Sp mutat.

Aquests resultats indiquen que el lloc Sp situat entre -53 i -44 pb en relació a l'inici de transcripció del promotor de *GCK* d'orada, és responsable de la transactivació per Sp1. Addicionalment, hem demostrat que Sp3 és un repressor de l'activació mitjançada per Sp1 a través de competició pel mateix lloc d'unió.



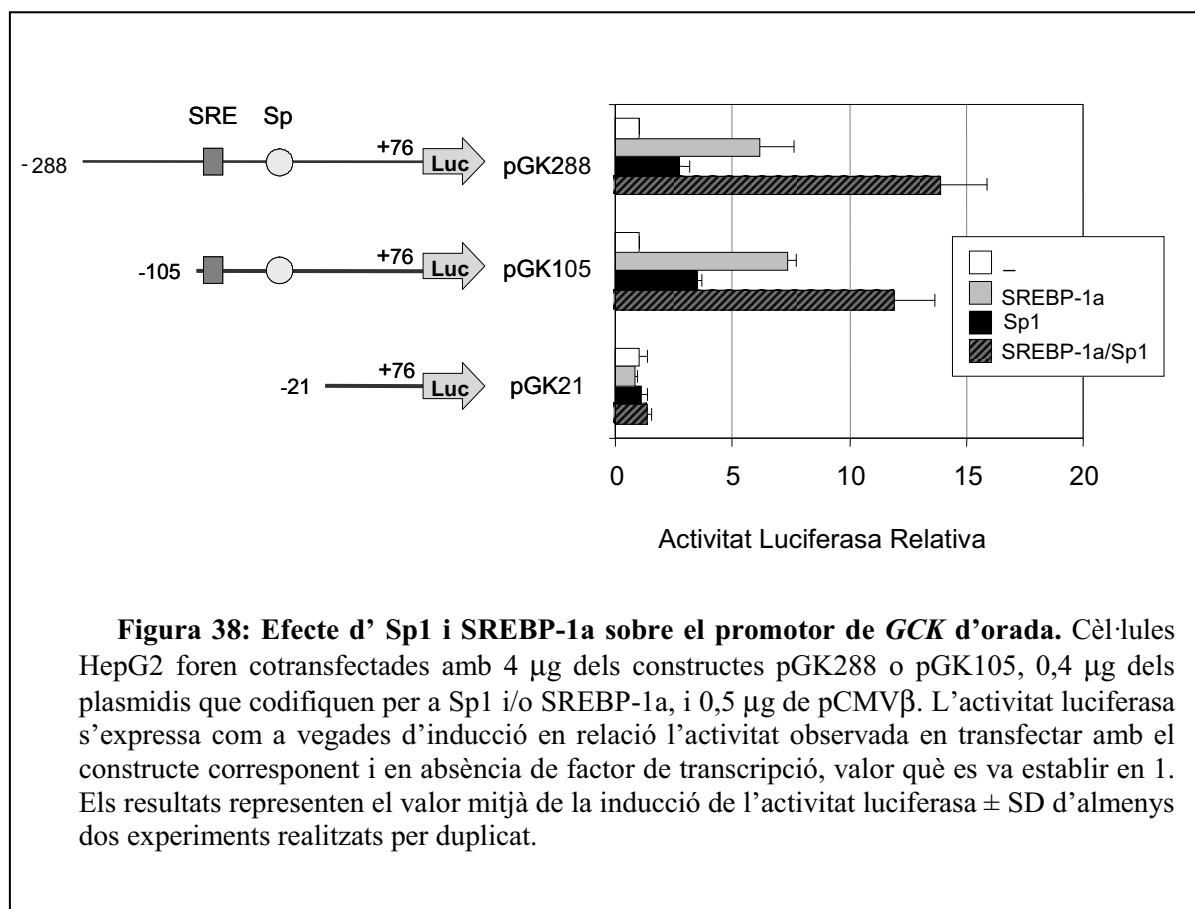
3.12 EFFECTE DE LA INSULINA EN L'EXPRESSION D' Sp1 I Sp3 EN FETGE D'ORADA

Tot i que els llocs d'unió a Sp1 són molt comuns en molts gens de resposta a insulina i han estat descrits llocs possibles d'unió a Sp1 en seqüències de rata i ratolí de *GCK* (Magnuson i col·l 1989a; Postic i col·l 1995; Samson i Wong, 2002), la implicació de les proteïnes Sp en l'activació de *GCK* no ha estat estudiada. Per conèixer la participació de la insulina en l'expressió d'Sp1 i Sp3 hem analitzat l'abundància dels nivells de proteïna d'Sp1 i Sp3 en fetge d'orades tractades amb insulina. Les orades es van tractar amb solució salina o insulina, i es van recollir mostres hepàtiques 6 hores després del tractament (apartat 2.1.1.A.2). Experiments de *Western blot* mostren que la insulina promou un increment dels nivells proteics d'Sp1, mentre que no s'observen modificacions en els nivells d'Sp3 (figura 37). Tal com s'havia descrit en rata (Keembiyehetty i col·l, 2002), es pot observar que la insulina també estimula l'expressió d'Sp1 en orades.



3.13 MODULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE LA GCK EN PRESENCIA D'Sp1 I SREBP-1a

Per tal d'estudiar si existeix un possible efecte sinèrgic entre Sp1 i SREBP-1a sobre l'activitat promotora de *GCK* es van cotransfectar cèl·lules HepG2 amb els plasmidis que codifiquen per a ambdós factors (apartat 2.1.4.A), i amb constructes que contenen els llocs d'unió per a SREBP-1a i Sp1 en el promotor de *GCK* d'orada (pGK288 i pGK105). Com a control negatiu es va utilitzar un constructe en què estan absents els dos llocs d'unió esmentats (pGK21). Les anàlisis de les activitats luciferasa mostraven que els efectes eren additius i no existia sinèrgia entre ambdós factors (figura 38).



3.14 EFECTE DE LA INSULINA SOBRE L'ACTIVITAT PROMOTORA DE GCK

Tal i com hem indicat prèviament (apartat 3.1) l'expressió hepàtica de *GCK* d'orada està regulada en resposta al tractament de les orades amb insulina. Per tal d'estudiar l'efecte de la insulina sobre l'activitat promotora de *GCK* de fetge d'orada, es van realitzar experiments de cotransfecció transitòria en cèl·lules HepG2 amb el constructe reporter pGK1321 juntament amb el plasmidi d'expressió que codifica per al receptor B d'insulina. Setze hores després de la transfecció es van incubar les cèl·lules amb diferents concentracions d'insulina (10, 100 i 500 nM). Es va mesurar l'activitat luciferasa sis hores després de l'addició de la hormona. En analitzar l'efecte en presència de diferents concentracions d'insulina, vam observar que l'activació depèn de la concentració d'insulina amb què s'incuben les cèl·lules. Com es pot observar en la figura 39, la insulina promou un increment, depenent de la dosi, entre 4 i 12 vegades de l'activitat promotora en relació a l'activitat basal del mateix constructe.

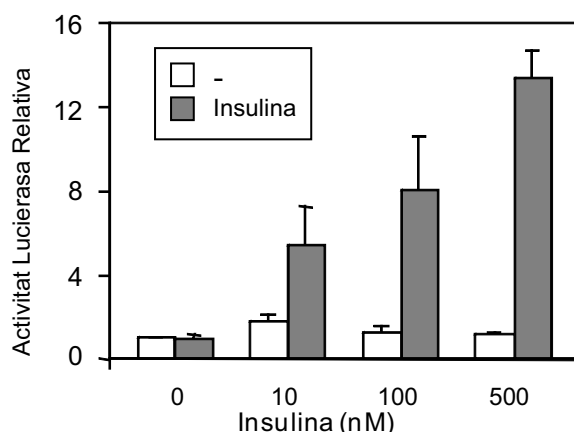


Figura 39: Efecte de la insulina sobre el promotor de *GSK* d'*Sparus aurata* en cèl·lules HepG2. Les cèl·lules HepG2 van ser transfectades transitòriament amb 4 µg del constructe pGK1321, i 0,4 µg del vector d'expressió que codifica per al receptor B d'insulina humana. Després de la transfecció les cèl·lules foren incubades amb 10, 100 o 500 nM d'insulina bovina en medi lliure de sèrum. Sis hores després de l'addició d'insulina es va mesurar l'activitat luciferasa. L'activitat luciferasa s'expressa com a vegades d'inducció en relació l'activitat observada en transfectar amb el constructe corresponent i en absència d'insulina. Les dades representen la mitja ± SD dels valors de dos experiments independents efectuats per duplicat.

3.14.1 PAPER D'Sp1 I SREBP-1a EN L'ACTIVACIÓ DE GSK DEPENDENT D'INSULINA

Els mecanismes a través dels quals la insulina regula la *GSK* romanen encara en controvèrsia, i els elements en *cis* a través dels quals actua són encara desconeguts. Alguns autors han indicat que SREBP-1c podria actuar com a mediador de la insulina en l'expressió de *GSK* (Foretz i col·l, 1999a; Kim i col·l, 2004a). Altres estudis posen en dubte aquesta implicació (Stoeckman i col·l, 2002; Ribaux col·l, 2003). Recentment, Gregori i col·l (2006) recolzen aquesta última hipòtesi, al mostrar que la inducció de l'expressió de *GSK* pot produir-se en absència de la forma madura nuclear d'SREBP-1.

S'ha descrit que Sp1 podria participar en la regulació per insulina de molts gens, pel fet de detectar la presència d'elements GC en gens que responen a insulina (Samson i Wong, 2002). El paper d'Sp1 en la regulació a través d'insulina no és uniforme i depèn de les característiques de cada promotor. S'ha identificat Sp1 com a mediador de l'acció inductora de la insulina en el promotor de l'apolipoproteïna A1 (Murao i col·l, 1998) i en el promotor de la leptina (Moreno-Aliaga i col·l, 2007).

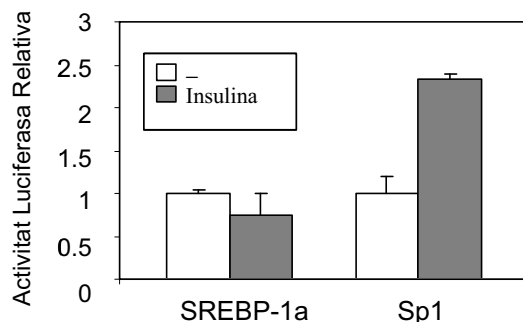
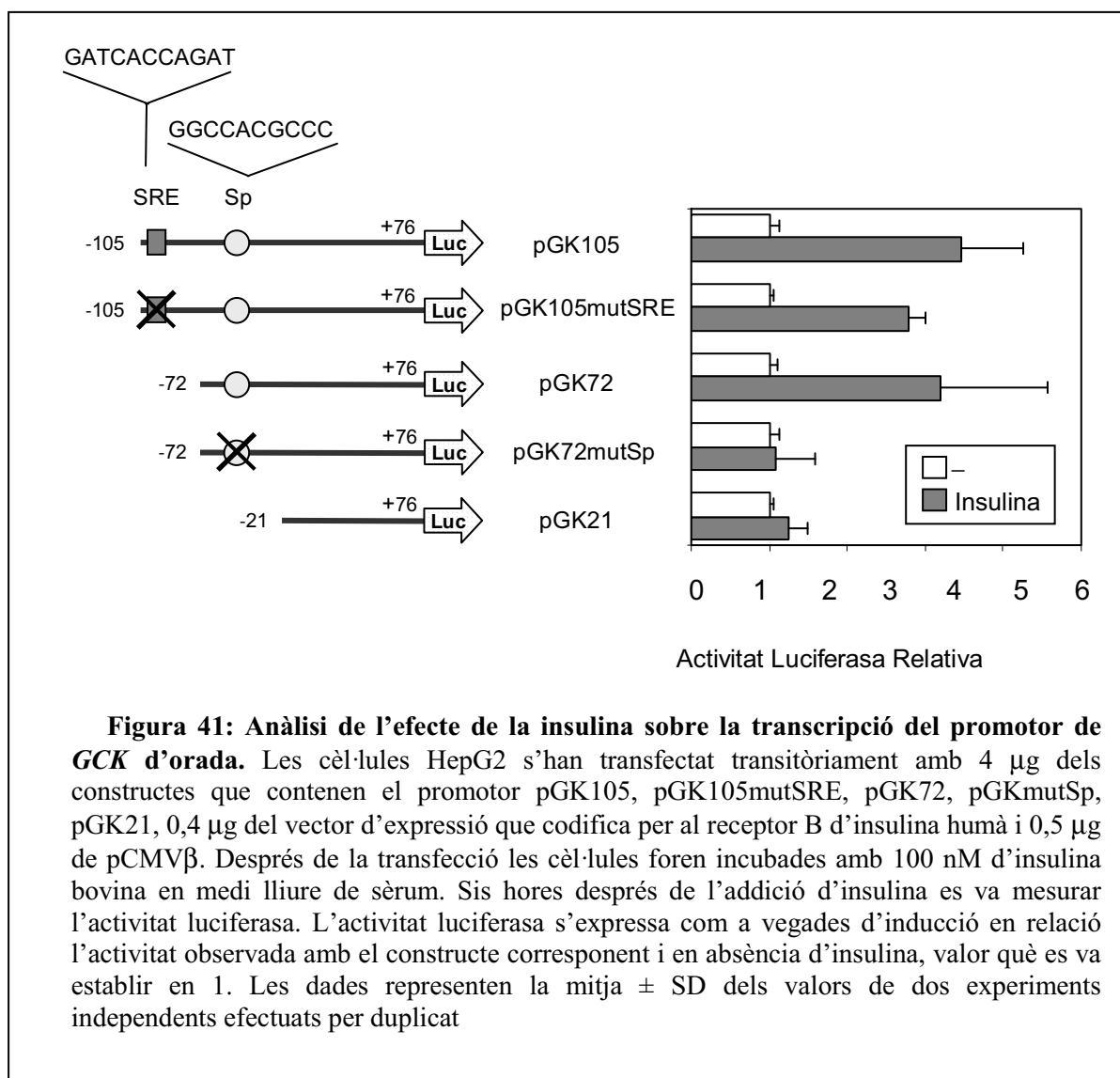


Figura 40: Anàlisi de l'efecte de la insulina en presència d'SREBP-1a o Sp1 sobre el promotor de *GCK* d'orada. Les cèl·lules HepG2 s'han transfectat transitòriament amb 4 µg del constructe pGK1321, 0,4 µg dels plasmidis que codifiquen per a SREBP-1a o Sp1, 0,4 µg del vector d'expressió que codifica per al receptor B d'insulina humana, i 0,5 µg de pCMVβ. Després de la transfecció, les cèl·lules foren incubades en presència de 100 nM d'insulina bovina en medi lliure de sèrum. Sis hores després de l'addició d'insulina es va mesurar l'activitat luciferasa. L'activitat luciferasa s'expressa com a vegades d'inducció en relació l'activitat observada en absència d'insulina, valor que es va establir en 1. Les dades representen la mitja ± SD dels valors de dos experiments independents efectuats per duplicat.

A l'objecte d'estudiar la implicació d'SREBP-1a i Sp1 en la inducció del promotor de *GCK* en resposta a insulina, vam realitzar assajos de transfecció transitòria en cèl·lules HepG2. Es van cotransfectar les cèl·lules amb el constructe reporter pGK1321, el vector d'expressió pel receptor B de la insulina, i els vectors d'expressió dels factors de transcripció Sp1 o SREBP-1a. La incubació amb insulina (100 nM) de les cèl·lules cotransfectades amb els constructes reporters del promotor de *GCK* i el plasmidi d'expressió per a SREBP-1a no va produir cap efecte comparat amb l'observat en la incubació realitzada en absència d'insulina. Pel contrari, la incubació amb insulina de les cèl·lules cotransfectades amb el promotor de *GCK* i el plasmidi que codifica per al factor de transcripció Sp1 promovia l'increment de l'efecte d'Sp1 respecte l'activitat promotora de *GCK* en absència d'insulina (figura 40). Aquests resultats suggereixen que, tal com s'ha descrit recentment (Gregori i col·l, 2006), el factor de transcripció SREBP-1a no sembla estar implicat en la inducció de *GCK* per insulina. D'altra banda, els nostres resultats indiquen que el factor de transcripció Sp1 podria estar implicat en el mecanisme a través del qual la insulina indueix el promotor de *GCK*.

Per tal de corroborar la participació d'Sp1 en l'activació transcripcional a través d'insulina, es van cotransfectar cèl·lules HepG2 amb els constructes pGK105, pGK105mutSRE, pGK72, pGK72mutSp o pGK21 i el plasmidi d'expressió per al receptor B de la insulina (figura 41). En incubar les cèl·lules amb insulina (100 nM), vam observar que tant el constructe pGK105 com pGK105mutSRE mostraven inducció per insulina. Per tant, la mutació del lloc SRE no modificava l'efecte observat quan els constructes no estaven mutats. Aquest fet suggereix que el lloc SRE del promotor de *GCK* no és necessari per a la inducció de l'activitat promotora per insulina. Pel contrari, en cotransfectar cèl·lules amb el constructe pGK72mutSp i incubar-les amb insulina, vam observar que desapareixia la inducció del promotor per insulina. Aquests resultats indiquen que el lloc Sp és necessari per a què es produeixi l'efecte inductor de la insulina sobre el promotor de *GCK* i que, per tant, Sp1 estaria implicat en l'activació de *GCK* en resposta a insulina.



4. DISCUSSIÓ

4.1. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE *GCK* PER GLUCOSA I INSULINA EN FETGE D'ORADA

Els nivells plasmàtics de glucosa en peixos carnívors estan sotmesos a un control molt menys estricte que l'observat en mamífers. Aquests organismes metabolitzen la glucosa més lentament i aprofiten menys els carbohidrats de la dieta (Christiansen i col·l, 1987, Cowey i Walton, 1989; Wilson R.P., 1994). En mamífers, la *GCK* catalitza la fosforilació de la glucosa (Weinhouse i col·l, 1976) i és considerada un dels enzims clau en el control de l'homeòstasi de glucosa (Rossetti i col·l, 1993).

La baixa capacitat de modulació de la conversió entre glucosa i glu-6P per absència de *GCK* hepàtica estava considerada com a una de les causes principals de la intolerància a la glucosa observada en peixos carnívors (Christiansen i col·l, 1987; Cowey i Walton, 1989; Wilson R.P., 1994; Moon T.W., 2001). El clonatge i l'expressió del cDNA que codifica per a la *GCK* hepàtica d'orada (Caseras i col·l, 2000) va permetre demostrar l'existència d'aquest enzim en peixos, i descartar la manca de *GCK* com a factor desencadenant de la intolerància relativa a glucosa en peixos carnívors. Experiments realitzats en el nostre grup mostren que l'expressió de *GCK* està regulada en funció de les condicions nutricionals, tant a nivell d'mRNA com a nivell d'activitat enzimàtica (Caseras i col·l, 2000, 2002; Metón i col·l, 2004).

La insulina exerceix efectes anabòlics en fetge, teixit adipós, i múscul esquelètic i cardíac a través del receptor d'insulina (Virkamaki i col·l, 1999). Indueix la transcripció d'enzims clau en la glicòlisi com *GCK*, *PK* i inhibeix l'expressió d'enzims gluconeogènics com *G6PC* i *PEPCK* (Granner i col·l, 1983; Iynedjian i col·l, 1988, 1989, 2000; Girard i col·l, 1997; Salgado i col·l, 2004; Onuma i col·l, 2006; Hall i col·l, 2007). Inicialment, es pensava que la secreció d'insulina era deficient en peixos (Palmer i col·l, 1972; Furichi i col·l, 1981). Més endavant, però, es va observar que les concentracions plasmàtiques d'insulina són més elevades en peixos que en mamífers, i que després d'una càrrega intraperitoneal o intravenosa de glucosa els nivells d'insulina en truita augmenten (Mommsen i Plisetskaya, 1991; Carneiro i col·l, 1993; Blasco i col·l, 1996). Contràriament al que alguns autors havien proposat, els peixos no són organismes deficientes en insulina (Thorpe i col·l, 1976; Plisetskaya E.M., 1994). És més, dietes riques en carbohidrats promouen l'increment dels nivells plasmàtics d'insulina (Párrizas i col·l, 1994b), dels receptors d'insulina i d'IGF a nivell muscular en truita (Baños i col·l, 1998). Han estat identificades cèl·lules β pancreàtiques (Abad i col·l, 1986) i han estat mesurats nivells d'insulina en *Sparus aurata* (Guyot i col·l, 1998).

En peixos, l'acció de la insulina sobre l'expressió de *GCK* no havia estat descrita. Resultats mostrats en aquesta tesi indiquen que l'expressió de *GCK* hepàtica d'orada està regulada per insulina. L'administració intraperitoneal d'insulina en orades promou un augment dels nivells de missatger de *GCK* hepàtica. Així mateix, l'administració

intraperitoneal de glucosa a les orades, condueix també a un increment en els nivells d'mRNA de *GCK*. Aquests resultats estan en concordança amb estudis previs que assenyalen que els nivells d'expressió de *GCK* hepàtica d'orada incrementen després de l'alimentació amb dietes riques en carbohidrats (Caseras i col·l, 2000), situació en què la glucèmia està incrementada i s'estimula l'alliberació d'insulina.

L'expressió de *GCK* hepàtica en orada només es detecta quan s'administren dietes d'elevat contingut en carbohidrats (Caseras i col·l, 2000). Si bé alguns autors van assenyalar la manca de *GCK* en fetge d'orades com a factor clau en la baixa capacitat dels peixos carnívors a utilitzar carbohidrats (Christiansen i col·l, 1987; Cowey i Walton, 1989; Wilson R.P., 1994); la falta de detecció d'expressió de *GCK* podria ser deguda a l'administració de dietes pobres en carbohidrats o dietes amb carbohidrats poc assimilables pels peixos, i no a l'absència de l'enzim. En fetge d'orades alimentades amb dietes pobres en carbohidrats, la gluconeogènesi predomina per sobre de la glicòlisi i està sustentada amb compostos sintetitzats *de novo* a partir de lactat, aminoàcids i glicerol. De fet, aquesta via és considerada molt important en peixos carnívors (Cowey i Walton, 1989; Baanante i col·l, 1991).

Les orades presenten una certa capacitat per adaptar el seu metabolisme a la ingesta de quantitats creixents de carbohidrats (Metón i col·l, 1999b, 2000a). L'estimulació de l'expressió de *GCK* per glucosa contribuiria a estimular la glucòlisi, l'acumulació de glucogen i la síntesi d'àcids grassos. L'adaptació dels peixos carnívors a alimentar-se amb dietes amb quantitats creixents de carbohidrats és un fet important, ja que un dels objectius principals de la investigació nutricional en l'aqüicultura és disminuir la quantitat de proteïna en la dieta, substituint-la, en part, per carbohidrats o lípids. L'excés de proteïna en la dieta produeix un increment de la degradació d'aminoàcids per a fins energètics, i la conseqüent alliberació de residus nitrogenats per part dels peixos a l'ambient, fet que condueix a l'eutrofització de les aigües (Pillay i col·l, 1992; Pearson i Black, 2001; Davenport i col·l, 2003). La substitució de part de les proteïnes de la dieta per carbohidrats també permetria reduir els costos de producció i disminuir l'esquilmació d'espècies utilitzades per a la fabricació de pinsos per alimentar peixos en cultiu. És important la utilització de carbohidrats digeribles en les dietes comercials per a peixos, la qual cosa millora en gran mesura l'assimilació dels carbohidrats (Palmer i col·l, 1972; Pieper i col·l, 1980; Kaushik i col·l, 1985; Kim i col·l, 1992; Capilla i col·l, 2003). En aquesta línia, estudis recents mostren que poden substituir-se proteïnes de la dieta per farines gelatinitzades, sense afectar negativament al creixement de les orades (Fernández i col·l, 2007).

4.2. REGULACIÓ DE LA GCK HEPÀTICA D'ORADA PER LA GKRP

La GKRP presenta un paper clau en la regulació post-traducciona de *GCK* en mamífers. Entre d'altres funcions, està implicada en la regulació de la localització subcel·lular de *GCK* a fetge de rata (de la Iglesia i col·l, 1999, 2000; Shiota i col·l, 1999; Agius i Stubbs, 2000; Van Schaftingen i Veiga-da-Cunha, 2004).

En cultius d'hepatòcits de rata incubats amb baixa concentració de glucosa, i en fetges de rates en dejuni, la GCK es manté en el nucli unida a la GKRP (Toyoda i col·l, 1994, 1995; Brown i col·l, 1997; de la Iglesia i col·l, 1999; Fernández-Novell i col·l, 1999). En ratolins *knock-out* per a GKRP, la GCK no es manté retinguda en el nucli en condicions de baixa concentració de glucosa, fet que assenjala el paper rellevant de la GKRP en la localització subcel·lular de la GCK (Farrelly, i col·l, 1999; Grimsby i col·l, 2000). Aquests ratolins mostren, durant les proves de tolerància a glucosa, una relativa hiperglicèmia relacionada amb la manca de reserves nuclears de GCK ocasionada per l'absència de GKRP (Grimsby i col·l, 2000).

Quan s'analitzen talls de fetge de rates realimentades o quan els hepatòcits són exposats a concentracions de glucosa similars a les assolides postprandialment, s'observa translocació de GCK al citoplasma (Toyoda i col·l, 1994; 1995; de la Iglesia i col·l, 1999; Fernández-Novell i col·l, 1999; Van Schaftingen i Veiga da Cunha, 2004).

Mentre que en relació a la translocació de GCK hi ha consens general, existeix controvèrsia sobre la localització subcel·lular de la GKRP (Toyoda i col·l, 1995; Brown i col·l, 1997; de la Iglesia i col·l, 1999). Inicialment, es va descriure que tant la GCK com la GKRP estaven localitzades en el citoplasma (Van Schaftingen i col·l, 1992; Cardenas i col·l, 1995). Altres autors defensen que en fetge de rates realimentades la GKRP es manté sempre en el nucli, fins i tot quan s'incuben cultius d'hepatòcits amb baixes i altes concentracions de glucosa (Agius i col·l, 1995; Brown i col·l, 1997; Farrelly i col·l, 1999; Fernández-Novell i col·l, 1999; de la Iglesia i col·l, 1999). Pel contrari, s'ha detectat que la GKRP es transloca al citoplasma quan hepatòcits de rata en cultiu s'incuben en presència d'elevada concentració de glucosa (Toyoda i col·l, 1995; Mukhtar i col·l, 1999). En concordança amb aquests estudis, experiments de transfecció transitòria de cèl·lules CHO amb plasmidis d'expressió per a la GKRP de rata i proteïnes de fusió GFP-GCK d'orada o rata (control), mostraren que tant la GKRP com la GCK es localitzen en el nucli en incubar les cèl·lules amb baixa concentració de glucosa (5 mM), mentre que ambdues proteïnes es localitzen en el citoplasma en incubar les cèl·lules CHO amb concentracions de 25 o 50 mM de glucosa.

Fins al moment no existeixen evidències experimentals que assenyalin la presència d'una proteïna homòloga a la GKRP a fetge de cap espècie de peix i fins i tot alguns autors, basant-se en estudis de *Western blot* amb anticossos heteròlegs, han afirmat que aquesta proteïna no s'expressa a fetge de truita (Vandercammen i Van Schaftingen, 1993). La GKRP ha estat detectada, en canvi, a tortuga i gripau, encara que, en aquests casos, la seva funció no està regulada per la presència de fru-6P o fru-1P (Vandercammen i Van Schaftingen, 1993). S'ha observat que *Xenopus laevis* expressa una proteïna reguladora de la GCK a nivell hepàtic i que l'activitat GCK és inhibida a fetge per una proteïna homòloga a GKRP i també per la GKRP de rata (Vandercammen i Van Schaftingen, 1991; Veiga-da-Cunha i col·l, 1996a). Malgrat s'ha descrit que la GKRP no està present en peixos, els aminoàcids E⁵² H¹⁵³ K¹⁵⁴ K¹⁵⁵ L¹⁵⁶ V²¹⁵ N²¹⁶ presents en la seqüència deduïda per a GCK d'orada corresponen als residus considerats importants per a la unió de GCK de fetge de rata a la GKRP (Veiga-da-Cunha i col·l, 1996a). Així mateix, s'ha detectat que en carpa i truita també es conserven aquests aminoàcids. Per tant, la GCK d'orada té una localització subcel·lular similar a l'enzim de

mamífers i manté els aminoàcids que poden ser importants per a la unió a una proteïna reguladora homòloga a la GKR. P.

Els resultats mostrats en aquesta memòria indiquen que la GCK d'orada és retinguda al nucli per la GKR de rata quan les cèl·lules són incubades amb glucosa a baixa concentració. En augmentar la concentració de glucosa a 25 o 50 mM, la GCK d'orada es localitza en el citoplasma juntament amb la GKR de rata.

Aquest estudi aporta evidències de la possible regulació de GCK d'orada per una proteïna reguladora homòloga a la GKR.

La GCK hepàtica de rata presenta un senyal NES, ric en leucines, que facilita el transport de proteïnes des del nucli cap al citoplasma (Ullman i col·l, 1997). Aquest senyal, estaria implicat en la sortida de GCK hepàtica de rata del nucli al citosol (Shiota i col·l, 1999). La seqüència deduïda per a la GCK hepàtica d'*Sparus aurata* presenta un canvi en la regió corresponent a la seqüència NES identificada a l'enzim de fetge de rata. En orada es detecta una valina en la posició corresponent a la leucina 307 de rata (figura 42).

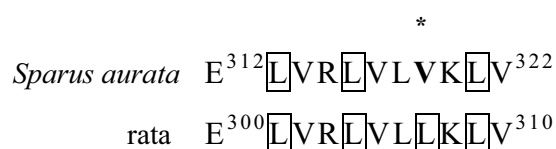


Figura 42: Aminoàcids corresponents a la seqüència NES de la GCK de rata i la seqüència homòloga en orada. Els aminoàcids considerats importants estan enquadrats. La leucina que no està conservada en la seqüència de GCK hepàtica de d'orada en relació amb la de rata està assenyalada amb un asterisc.

La valina és un aminoàcid de tipus hidrofòbic no polar, com la leucina. En base als nostres resultats, aquest canvi no sembla important per evitar que es produeixi la translocació, tot i que no s'ha de descartar que la modificació observada en el teòric NES de GCK hepàtica d'orada pugui tenir algun tipus d'implicació metabòlica. De fet, una pèrdua parcial de funcionalitat de l'hipotètic senyal NES de GCK d'orada podria tenir com a conseqüència que aquest enzim migrés més lentament des del nucli cap al citosol. En aquestes circumstàncies, la metabolització de la glucosa començaria de forma retardada i això podria contribuir en certa mesura a la relativa intolerància a la glucosa que caracteritza als peixos carnívors. Aquest mecanisme contribuiria igualment al retard general observat en el metabolisme dels carbohidrats a fetge d'orada. Cal tenir en compte però, que per confirmar aquesta hipòtesi s'hauria d'estudiar, entre d'altres, la funcionalitat del teòric NES per mutagènesi dirigida.

Els nostres estudis suggereixen que la translocació de la GCK hepàtica d'orada està regulada per la GKR de rata i els nivells de glucosa. Tot i que s'havia descrit que la GKR

no existeix en peixos (Vandercammen i Van Schaftingen, 1993), resultats d'aquesta memòria i l'anàlisi *in silico* de la seqüència aminoacídica de GCK hepàtica d'orada permeten suggerir que la GCK podria estar regulada per una proteïna homòloga a GKRP en fetge d'orada, i descartar així la manca de GKRP com a possible mecanisme implicat en la intolerància a la glucosa descrita en l'orada.

4.3. CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DEL PROMOTOR DE GCK D'ORADA

La GCK és un enzim clau en la regulació del metabolisme de la glucosa. La seva importància es posa de manifest en el fet que mutacions en GCK en humans poden causar síndromes d'hiperglicèmia i hipoglucèmia (Froguel i col·l, 1992; Hattersley i col·l, 1992; Magnuson i Matschinsky, 2004; Velho i col·l, 2004). S'han detectat diverses mutacions en la seqüència proteica de la GCK relacionades amb la diabetis tipus 2 en humans (Stoffel i col·l, 1992; Gidh-Jain i col·l, 1993; Burke i col·l, 1999; Davis i col·l, 1999; Miller i col·l, 1999; Galan i col·l, 2006; García-Herrero i col·l, 2007). D'altra banda, el descobriment de compostos activadors de la GCK que s'uneixen a un lloc alostèric produint una disminució de la glucèmia en animals sans i diabètics, subratlla el paper determinant de la GCK en el metabolisme hepàtic dels carbohidrats. S'ha descrit que l'acció d'aquests compostos promou l'alliberació d'insulina i la disminució de la producció de glucosa en fetge (Grimbsy i col·l, 2003, 2004)

Els símptomes postprandials que caracteritzen la diabetis de tipus 2 en humans es donen en peixos carnívors quan s'alimenten amb dietes d'elevat contingut en carbohidrats o se'ls administra glucosa. S'ha demostrat que la GCK de peixos està sotmesa a regulació nutricional (Caseras i col·l, 2000). Malgrat això, els nivells d'activitat GCK en peixos són més baixos que en rates alimentades, encara que són similars als descrits per rates dejunades o diabètiques (Iynedjian i col·l, 1987, 1988, 1989; Magnuson i col·l, 1989a; Caseras i col·l, 2000). La baixa habilitat dels peixos per metabolitzar carbohidrats pot ser resultat, en part, d'una GCK menys eficient que l'enzim de mamífers. De fet, la GCK hepàtica d'orada mostra una afinitat per la glucosa 3-4 vegades inferior a l'observada per a la GCK de fetge de rata (Caseras i col·l, 2000).

En aquest context, i a fi d'esbrinar els possibles punts importants en el control de la GCK, ens vam plantejar l'estudi de la regulació transcripcional del promotor de la *GCK* hepàtica d'orada. Per tal de conèixer els factors de transcripció implicats en la regulació d'aquest enzim ens proposàrem dur a terme el clonatge i caracterització del promotor de *GCK*.

La regió adjacent a l'extrem 5' del cDNA de *GCK* d'orada es va clonar mitjançant la tècnica del passeig cromosòmic. Mitjançant la tècnica d'*SMART RACE PCR* vam determinar l'inici de transcripció, que es troba situat 98 nucleòtids corrent amunt respecte l'inici de traducció del missatger. L'alineament de la seqüència d'orada amb les seqüències descrites per a humans, rata i ratolí revela una baixa homologia en la regió 5' del gen *GCK* d'orada.

La seqüència corresponent a la GCK hepàtica d'orada presenta en el seu extrem 5' tres codons AUG en fase (figura 43):

97 gagaugccgu gugucagcuc ucaacucgac cagaugguga aaaugcc
M P C V S S Q L D Q M V K M P

Figura 43: Seqüència nucleotídica i aminoacídica corresponent al fragment del missatger que codifica per a l'extrem N-terminal de la GCK hepàtica d'orada. La seqüència nucleotídica està representada en minúscules. Els tres primers codons AUG en fase estan subratllats i marcats en negreta. La seqüència aminoacídica deduïda per a la GCK hepàtica d'*Sparus aurata* està representada en majúscules.

El primer codó AUG es troba flanquejat per una seqüència de baixa homologia amb la seqüència Kozak (1987) (GCC) GCCRCCAUGG; R= G o A. Els nucleòtids més crítics són el de la posició -3 que està normalment ocupat per una purina, i + 4, ocupat per una guanina, essent A, de l'AUG, la posició +1 (Kozak M., 1996, 1997). Els altres nucleòtids propers a AUG semblen ser menys importants, tot i que la influència dels nucleòtids en les diferents localitzacions poden variar entre espècies. La presència de l'AUG, que dirigeix la traducció a proteïna GCK hepàtica d'orada, en una seqüència amb baixa homologia a la seqüència Kozak podria causar un baix nivell d'expressió d'aquest enzim. Experiments de transcripció/traducció *in vitro* ens van permetre demostrar que el primer codó AUG és fonamental per donar lloc a una proteïna d'un pes molecular de 54 kDa, mida que correspon a l'observada en els experiments de transcripció/traducció *in vitro* efectuats en un sistema per sintetitzar proteïnes d'organismes eucariotes (Caseras i col·l, 2000). Tot i que es troba en un entorn de baixa homologia amb la seqüència Kozak, l'entorn és suficientment favorable per promoure l'inici de la traducció, ja que presenta una purina en posició -3 (GAGAUGC) (Kozak, 1991). Els nostres estudis indiquen que en absència del primer AUG, el tercer AUG pot dirigir la traducció generant una proteïna de mida més petita. El tercer codó AUG de la seqüència corresponent a la GCK hepàtica d'orada es troba en un entorn Kozak suficientment favorable, perquè compta amb una adenina en posició -3 (AAAAUGC), però no sembla ser un codó funcional en condicions normals, ja que dona lloc a una isoforma de pes molecular inferior a 54 kDa. A partir del tercer codó AUG es generaria una proteïna amb 13 aminoàcids menys en el seu extrem amino terminal, que no apareix quan el primer codó està intacte. El segon AUG, en canvi, no es troba en un context favorable per iniciar la traducció, ja que malgrat que conté una G en posició +4, presenta en la posició -3 una citosina (CAGAUGGU). Addicionalment, en els experiments de transcripció/traducció *in vitro*, hem detectat la formació d'un pèptid de mida més petita que podria correspondre a una forma truncada o

resultat de degradació. En aquest sentit, s'ha descrit que el gen *GCK* de rata experimenta un processament alternatiu que dona lloc a proteïnes inactives més curtes (Magnuson i col·l, 1989b; Liang i col·l, 1991; Tanizawa i col·l, 1991). La identificació de proteïnes truncades o privades d'activitat enzimàtica pot suposar una via addicional de control en l'expressió de la *GCK*.

La *GCK* està present en fetge d'orada, truita i carpa (Caseras i col·l, 2000; Panserat i col·l, 2000a). Experiments d'RT-PCR a partir de diferents teixits d'orada ens ha permès confirmar que l'expressió de *GCK* té lloc fonamentalment a fetge. L'absència d'expressió de *GCK* en altres teixits està en concordança amb estudis efectuats en carpa i truita (Panserat i col·l, 2000b).

D'altra banda, l'aïllament del fragment genòmic adjacent a l'extrem 5' del cDNA que codifica per a *GCK* hepàtica d'orada, ens ha permès analitzar les característiques de la seqüència i identificar elements en *cis* presents en la regió proximal del promotor. L'aplicació de programes informàtics indica la possible presència d'una caixa TATA situada entre els pb -33 i -19 i possibles regions d'unió a Sp, SREBP-1 Stat i USF, entre d'altres.

En base a la localització de l'inici de transcripció podem indicar que es forma un mRNA de 2058 pb, en concordança amb el transcrit de 2,1 kb prèviament detectat per *Northern blot* en fetge d'orada (Caseras i col·l, 2000; Metón i col·l, 2004).

Per tal d'examinar les regions adjacents a l'extrem 5' del cDNA clonat implicades en la regulació de l'activitat transcripcional del promotor de *GCK*, es van utilitzar constructes que contenen el fragment de 1397 pb aïllat per passeig cromosòmic, així com constructes que presentaven deleccions seqüencials en 5' d'aquest fragment fusionats a un gen reporter (luciferasa). Experiments de transfecció transitòria efectuats en cèl·lules HepG2 i cèl·lules D11 ens van permetre detectar que la regió promotora que inclou 288 pb corrent amunt respecte l'inici de transcripció és essencial per a la transcripció basal de *GCK* i per tant, constitueix el nucli del promotor funcional d'aquest gen. La transfecció de cèl·lules amb el constructe del promotor que conté una delecció de la regió compresa entre -21 i -288 pb respecte l'inici de transcripció confirma aquesta hipòtesi, ja que condueix a la desaparició de l'activitat promotora basal.

4.4. PAPER D'SREBP-1a EN LA REGULACIÓ DE GCK

Les isoformes d'SREBP-1 (SREBP-1a, SREBP-1c i SREBP-1ac) deriven d'un únic gen resultat de la utilització de promotors alternatius i de processament diferencial dels missatgers (Shimomura i col·l, 1997; Felder i col·l, 2005). Per dur a terme la seva funció, SREBP-1 requereix ser transportat del reticle endoplasmàtic a l'aparell de Golgi, on és proteolitzat per acció consecutiva de dues proteases, i posteriorment es transloca al nucli (Horton i col·l, 2002), on regula la transcripció a través de la unió a caixes E, proteïnes bHLH i seqüències SRE (Kim i col·l, 1995). S'ha descrit que SREBP està regulat nutricionalment en mamífers. L'expressió de la forma madura nuclear d'SREBP-1 en fetge de ratolí i rata està incrementada quan animals dejunats són realimentats amb dietes d'elevat contingut en carbohidrats (Horton i col·l, 1998; Kim i col·l, 1998; Foretz i col·l, 1999b; Gosmain i col·l, 2005).

S'ha descrit que SREBP-1 regula la transcripció de *GCK* en mamífers. Així mateix, regula la transcripció d'altres gens que codifiquen per a enzims implicats en el control de la glucòlisi/gluconeogènesi (Foretz i col·l, 1999a; Shimomura i col·l, 1999; Kim i col·l, 2004a; Gosmain i col·l, 2004; Yamamoto i col·l, 2004). La regulació per SREBP-1 de *GCK* de mamífers i la presència de caixes SRE en el promotor de *GCK* d'orada ens va conduir a estudiar el paper d'SREBP-1 en l'activitat transcripcional de *GCK* hepàtica d'orada. L'anàlisi del promotor ens va permetre identificar elements en *cis* en la regió proximal implicats en la transactivació per SREBP-1a. Experiments de transfecció transitòria de cèl·lules HepG2 i assajos de retardació en gel ens indiquen que SREBP-1a produeix una acció activadora a través de la unió a la caixa SRE, situada entre els pb -105 a -95 en relació a l'inici de transcripció del promotor de *GCK* d'orada. Pel contrari, experiments de transfecció transitòria utilitzant un plasmidi d'expressió per a SREBP-1c no promou canvis en la transcripció de *GCK*. La introducció de mutacions en la caixa SRE implicada en la unió d'SREBP-1a condueix a la desaparició de la unió d'SREBP-1a al promotor i de l'efecte activador sobre el promotor de la *GCK* d'orada. Aquests estudis demostren que SREBP-1a s'uneix a la caixa situada entre els pb -105 i -95 en relació a l'inici de transcripció de la *GCK* hepàtica d'orada i actua estimulant l'activitat transcripcional del promotor.

En el nostre grup també hem dut a terme el clonatge del promotor de *PFKFB1* d'orada. L'anàlisi de la regió proximal del gen *PFKFB1* va revelar la presència d'una caixa SRE. L'existència d'aquesta caixa i el fet de què SREBP-1 estigui implicat en el control transcripcional d'enzims reguladors de la glucòlisi i la gluconeogènesi (Shimomura i col·l, 1999; Foretz i col·l, 1999a; Gosmain i col·l, 2004; Kim i col·l, 2004a; Yamamoto i col·l, 2004), ens va portar a investigar el possible paper d'SREBP-1a sobre el promotor de *PFKFB1*, enzim clau en la regulació de la glucòlisi/gluconeogènesi. Partint de constructes amb deleccions a l'extrem 5' i mitjançant experiments de transfecció transitòria en cèl·lules HepG2 varem detectar que SREBP-1a activa el promotor de la *PFKFB1*. Assajos de retardació en gel van permetre confirmar la unió d'SREBP-1a específicament a la caixa localitzada entre els pb -56 a -48 en relació a l'inici de transcripció de la *PFKFB1* d'orada. La

mutació de la caixa SRE esmentada impedeix que es produeixi l'activació del promotor a través d'SREBP-1a. Aquests estudis indiquen que SREBP-1a també està implicat en l'activació transcripcional de *PFKFB1*, i ho fa a través de la unió a la caixa SRE situada entre els pb -56/-48.

Els nostres estudis mostren que el factor SREBP-1a regula l'activitat transcripcional dels promotors de *GCK* i *PFKFB1* de fetge d'orada, fet que suggereix que SREBP-1a és un factor de transcripció que juga un paper important en el control transcripcional d'enzims clau del metabolisme de la glucosa en fetge d'orada. Aquests estudis estan en concordança amb estudis previs, realitzats en mamífers, que atribueixen a SREBP-1 un paper important en la regulació transcripcional d'enzims glucolítics i gluconeogènics (Shimomura i col·l, 1999; Foretz i col·l, 1999a; Kim i col·l, 2004a; Gosmain i col·l, 2004; Yamamoto i col·l, 2004)

En base als resultats obtinguts vam considerar d'interès estudiar la regulació nutricional i hormonal d'SREBP-1 en fetge d'orades.

En rosegadors sotmesos a dejú, s'ha observat que la realimentació amb dietes d'elevat contingut en carbohidrats i baix contingut en greixos fa incrementar la quantitat de proteïna tant de la forma precursora com de la forma madura de SREBP, així com el missatger que codifica per a SREBP-1c en fetge (Horton i col·l, 1998; Kim i col·l, 1998; Foretz i col·l, 1999b; Shimomura i col·l, 1999; Liang i col·l, 2002; Zhang i col·l, 2005). En fetge de rata, l'expressió dels transcrits que codifiquen per a SREBP-1a i SREBP-1c disminueix en resposta al dejú, i incrementa amb la realimentació fins a nivells superiors als d'animals alimentats (Gosmain i col·l, 2005). Pel contrari, situacions de realimentació després d'un període de dejuni promouen només un efecte modest sobre SREBP-2 (Horton i col·l, 1998).

Al considerar, la regulació de l'expressió de SREBP-1 en fetge d'orades per l'estat nutricional observem que segueix un patró similar a l'observat prèviament en rosegadors. Experiments de *Western blot* mostren que en situacions de dejú la forma madura d'SREBP-1 pràcticament és indetectable. Nou hores després de la realimentació, amb dietes d'elevat contingut en carbohidrats, s'observa un increment de l'expressió tant de la forma precursora com de la forma madura d'SREBP-1 en fetge d'orades.

De manera similar a la realimentació, el tractament d'orades amb glucosa subministrada intraperitonealment condueix a un increment de l'expressió d'SREBP-1, tant a nivell de la forma precursora com de la forma madura. En concordança, alguns autors indiquen que la glucosa estimula el processament d'SREBP-1 (Sandberg i col·l, 2005; Zitzer i col·l, 2006). De forma anàloga, Hasty i col·l (2000) descriuen que la glucosa actua estimulants l'expressió d'SREBP-1 en hepatòcits de ratolins. Pel contrari, estudis amb hepatòcits primaris de rata mostren que la glucosa no produeix efectes sobre l'expressió d'SREBP-1c (Deng i col·l, 2002).

En els nostres estudis, en tractar orades amb insulina també s'ha detectat un increment de l'expressió d'SREBP-1, tant a nivell de forma precursora com a nivell de forma madura.

Aquests resultats estan en concordança amb la regulació nutricional i hormonal dels nivells de GCK i observacions prèvies descrites en hepatòcits de rata, en les que la insulina estimula la generació de la forma activa d'SREBP-1a a partir del precursor (Yellaturu i col·l, 2005). La insulina promou l'increment dels nivells d'expressió d'SREBP-1c i l'abundància tant de la forma precursora com de la forma madura d'SREBP-1 en fetge de rata (Azzout-Marniche i col·l, 2000; Cagen i col·l, 2005). En fetge de pollastres també s'ha detectat un increment en l'expressió de la forma madura d'SREBP-1 en resposta a insulina (Zhang i Hillgartner, 2004). L'efecte inductor d'insulina sobre l'expressió d'SREBP-1c també ha estat demostrat en teixit adipós de ratolins i humans (Kim i col·l, 1998; Ducluzeau i col·l, 2001), i en múscul de rates i humans (Guillet-Deniau i col·l, 2002).

4.5. PAPER D'Sp1 I Sp3 EN LA REGULACIÓ DE LA GCK

Les proteïnes Sp comprenen un elevat nombre de factors de transcripció homòlegs que poden controlar l'activació transcripcional a través de la unió a caixes GC/GT situades en les regions reguladores de gens diana (Suske G. 1999; Bowman & Philipsen 2002; Kaczynski i col·l, 2003). Les proteïnes Sp s'han identificat en diferents espècies des d'invertebrats a humans, incloent els peixos (Baudler i col·l, 1997; Zhao i col·l, 2003). Els membres de la família Sp contenen tres dits de zinc i un domini activador ric en serines i treonines. Malgrat l'elevada homologia estructural, les proteïnes Sp presenten un comportament funcional diferent. La regulació de la transcripció a través de les caixes GC/GT mitjançant les proteïnes Sp, és un procés que està finament controlat. Sp1 i Sp3 reconeixen i s'uneixen a les caixes GC/GT amb idèntica afinitat (Hagen i col·l, 1994). Sp1 està implicat en l'activació d'un elevat nombre de gens regulats i constitutius, mentre que Sp3 comprèn un domini addicional inhibitori que actua com a activador o repressor de l'activació transcripcional mitjançada per Sp1, depenent del promotor i del context cel·lular (Suske G. 1999; Bowman & Philipsen 2002; Kaczynski i col·l, 2003). Com que Sp1 i Sp3 poden coexistir en els mateixos tipus cel·lulars i poden competir pel mateix lloc d'unió *in vivo*, l'abundància relativa entre ambdós factors juga un paper important en la regulació dels seus gens diana. La relació Sp1/Sp3 depèn del tipus i condicions cel·lulars, i s'ha observat que varia durant el cicle cel·lular (Suske G. 1999). S'ha descrit que Sp1 intervé en el control transcripcional d'alguns enzims glicolítics, com la PK i l'aldolasa (Hermfisse i col·l, 1996; Schafer i col·l, 1996; Netzker i col·l, 1997).

La presència de caixes GC i GT en la regió promotora de *GCK* ens va portar a investigar el possible paper de Sp en l'activació transcripcional de *GCK*.

Per determinar el paper funcional d'Sp1 i Sp3 en relació amb la transcripció de *GCK*, varem efectuar experiments de transfecció transitòria utilitzant cèl·lules HepG2. Experiments de transfecció amb constructes reporters que contenen deleccions de l'extrem 5' del promotor de la *GCK* d'orada i els experiments de retardació en gel mostren que Sp1 promou l'activació transcripcional del promotor de *GCK* de fetge d'orada. Experiments de retardació en gel i immunoprecipitació de cromatina mostren que Sp1 interacciona específicament amb la caixa

localitzada entre els pb -53 a -44 en relació a l'inici de transcripció de *GCK*. Mutacions generades en la caixa GC bloquegen la unió d'Sp1 a la caixa GC mutada. Així mateix, en experiments de transfecció transitòria, observem que Sp1 no és capaç d'activar la transcripció del promotor de *GCK* amb la caixa Sp mutada. Sp3 també s'uneix específicament a la caixa Sp situada entre els pb -53 a -44, però no condueix a l'estimulació de l'activitat promotora de *GCK*, sinó que actua com a repressor de l'activació produïda per Sp1.

A fi d'investigar si l'activació transcripcional que exerceix Sp1 sobre el promotor de la *GCK* hepàtica d'orada és una característica exclusiva de peixos, es va subclonar el promotor de la *GCK* de rata en un vector reporter sense promotor (pGL3-Basic). Estudis previs (Magnuson i col·l, 1989a; Postic i col·l, 1995; Samson i Wong, 2002) indiquen que la *GCK* de mamífers conté un possible lloc d'unió Sp. No obstant això, no s'havia estudiat l'efecte d'aquest factor de transcripció sobre l'activitat transcripcional del promotor de la *GCK* de mamífers. La realització d'experiments de transfecció transitòria amb el constructe reporter que conté el promotor de *GCK* de rata, ens ha permès comprovar que Sp1 sembla tenir un paper activador de la transcripció de *GCK* en rata, anàleg a l'observat en orada. Com en l'orada, el factor Sp3 no produeix, per si sol, cap efecte sobre el promotor de *GCK* de rata, mentre que Sp3 en combinació amb Sp1 condueix a la repressió de l'activació produïda per Sp1. L'efecte d'Sp1 i Sp3 sobre el promotor de la *GCK* de rata és, per tant, similar al observat en el promotor de *GCK* d'orada. Aquests estudis suggereixen que la regulació de *GCK* pels factors Sp no és exclusiva de peixos, i podria ser un efecte extensiu als vertebrats.

Els dits de zinc en Sp1 i Sp3 estan molt conservats i tenen conseqüentment afinitats d'unió a DNA semblants (Hagen i col·l, 1994). S'ha descrit que, en molts casos, l'abundància relativa d'Sp1 i Sp3 pot estar correlacionada amb la regulació de gens diana. És el cas de la PK, la β -enolasa (Discher i col·l, 1998) i el receptor de la secretina humana (Pang i col·l, 2004). Una relació elevada d'Sp1/Sp3 causa l'estimulació de l'activitat promotora, mentre que quan la relació Sp1/Sp3 disminueix l'activació produïda per Sp1 es reprimeix. En concordança amb aquests resultats s'ha detectat que un mutant de Sp3, que no conté el domini d'unió a DNA, no és capaç de suprimir l'activació mitjançada per Sp1 del promotor artificial BCAT-2 (Hagen i col·l, 1994). Per avaluar l'efecte de variacions en la concentració relativa d'Sp1/Sp3 sobre el promotor de *GCK* hepàtica d'orada, es van realitzar experiments de transfecció transitòria amb cèl·lules HepG2 transfectades amb quantitats diferents dels plasmidis d'expressió d'Sp1 i Sp3, juntament amb un constructe reporter que conté el fragment del promotor de *GCK* d'orada que inclou el lloc Sp en estudi. A concentracions creixents d'Sp3, l'efecte repressor d'Sp3 sobre l'activació transcripcional de *GCK* promoguda per Sp1 incrementa, mentre que concentracions creixents d'Sp1 causen la reversió de l'efecte repressor produït per Sp3. Aquests resultats, juntament amb els obtinguts en experiments de retardació en gel, demostren que Sp1 i Sp3 competeixen pel mateix lloc d'unió al promotor de la *GCK* hepàtica d'orada. L'abundància relativa d'Sp1 i Sp3 és, per tant, un dels factors importants en el control de l'expressió de la *GCK* en fetge d'orada.

S'ha descrit que la insulina promou la síntesi i acumulació d'Sp1 en hepatòcits i en rates diabètiques (Pan i col·l, 2001, Keembiyehetty i col·l, 2002). Addicionalment, la insulina pot alterar la unió d'Sp1 al promotor, així com el seu estat d'activació a través d'*O*-glicosilació i fosforilació (Bouwman & Philipsen, 2002; Samson i Wong, 2002; Chu i Ferro, 2005; Majumdar i col·l, 2006; Mounier i Posner, 2006). El fet de què els llocs d'unió a proteïnes Sp estiguin presents en regions de resposta a insulina de nombrosos gens, suggereix que Sp1 podria actuar com a mediador de l'acció de la insulina (Samson i Wong, 2002). En orada, experiments de *Western blot* mostren que la insulina, a més d'estimular l'expressió de *GCK* hepàtica, promou un increment dels nivells proteics d'Sp1, mentre que els nivells d'Sp3 romanen inalterats. Aquests resultats permeten hipotetitzar que, en orades, les proteïnes Sp podrien estar implicades en la regulació de l'expressió de *GCK* hepàtica per insulina.

4.6. PAPER D'Sp1 I SREBP-1a EN L'ACTIVACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE GCK A TRAVÉS D'INSULINA

En aquesta memòria presentem resultats que indiquen que la insulina promou l'increment dels nivells d'mRNA de la *GCK* hepàtica d'orada. Aquests resultats són congruents amb altres estudis realitzats en orada que mostren que els nivells d'mRNA de *GCK* hepàtica són baixos en peixos dejunats, i que s'incrementen en períodes postprandials i en fetge d'orades alimentades amb dietes d'elevat contingut en carbohidrats (Caseras i col·l, 2000; Metón i col·l, 2004). D'altra banda, resultats del nostre grup mostren que la insulina també causa un increment de l'expressió de PFKFB1 i un descens en l'expressió de la subunitat catalítica de l'enzim gluconeogènic G6PC de fetge d'orada (Salgado i col·l, 2004; Metón i col·l, 2006).

En concordança amb els resultats observats en orada, la insulina indueix la transcripció d'altres enzims clau en la glicòlisi en rata, com *GCK* i *PK*, i inhibeix l'expressió de l'enzim gluconeogènic *PEPCK* (Granner i col·l, 1983; Iynedjian i col·l, 1988, 1989; Girard i col·l, 1997; Azzout-Marniche i col·l, 2000). No obstant això, el mecanisme a través del qual la insulina regula la *GCK* encara no està del tot clar.

Alguns autors indiquen que SREBP-1c podria ser el mediador de l'acció estimuladora de la insulina sobre la transcripció de la *GCK* (Foretz i col·l, 1999a). La transducció a través d'adenovirus del dominant negatiu de SREBP-1c inhibeix l'acció de la insulina en la regulació de la transcripció de *GCK* en hepatòcits, mentre que un dominant positiu de SREBP-1c evita la dependència d'insulina per l'expressió de *GCK*. D'altra banda, SREBP-1c media la inducció d'enzims lipogènics en múscul esquelètic de rata (Guillet-Deniau i col·l, 2004) en resposta a glucosa. És més, en hepatòcits de rata la glucosa potencia l'efecte activador d'SREBP-1c sobre l'expressió de *GCK* mediada per insulina (Foretz i col·l, 1999b). Kim i col·l (2004a) han identificat dos llocs SRE en el promotor de la *GCK* hepàtica de rata i observen que la insulina condueix a un increment en la unió d'SREBP-1 al promotor.

Pel contrari, estudis recents presenten evidències en contra de la participació d'SREBP-1 en la regulació transcripcional de *GCK* per insulina (Matsuzaka i col·l, 2004; Gregori i col·l, 2006; Hansmannel i col·l, 2006). Hansmannel i col·l (2006) descriuen que l'expressió de l'mRNA de *GCK* no està afectat per l'agonista del receptor hepàtic X, T0901317, el qual fa que incrementi el processament d'SREBP-1c. És més, la insulina i T0901317 indueixen sinèrgicament l'expressió d'SREBP-1c però no els nivells d'mRNA de *GCK*. La inducció de *GCK* en cultiu d'hepatòcits primaris per acció d'insulina dona lloc a una ràpida acumulació (2 hores) de l'mRNA que codifica per a *GCK*, mentre que la forma madura d'SREBP-1 no es detecta en el nucli fins a les 6 hores següents al tractament amb insulina (Gregori i col·l, 2006). Aquests autors indiquen a més, que el bloqueig d'SREBP-1 per RNAs d'interferència no afecta a la inducció de *GCK* per insulina.

Tot i que, inicialment s'havia descrit que Sp1 és un factor ubic que està implicat en la regulació de gens constitutius, Sp1 pot tenir un paper important en la mediació de l'acció de la insulina sobre la regulació transcripcional d'alguns gens (Samson i Wong, 2002). Sp1 està implicat en la regulació per insulina dels promotors de PAI-1 (inhibidor de l'activador del plasminogen) (Banfi i col·l, 2001), d'Apo AI (apolipoproteïna A I) (Murao i col·l, 1998; Zheng i col·l, 2000, 2001), i del gen que codifica per a la leptina en adipòcits de rata (Moreno-Aliaga i col·l, 2007). S'ha descrit que la regulació dependent d'insulina de l'enzim PEPCCK implica el desplaçament d'Sp1 de la unió amb el promotor d'aquest gen per part d'SREBP-1c (Chakravarty i col·l, 2004).

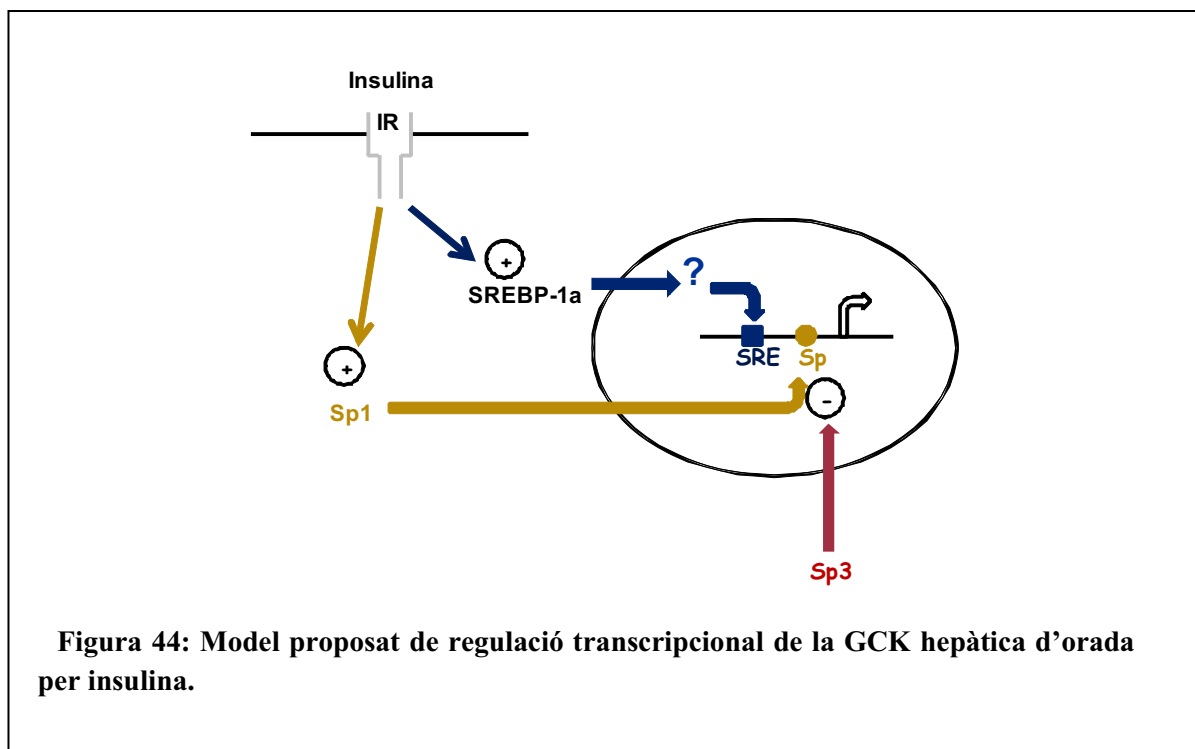
El tractament d'orades amb insulina promou un increment dels nivells proteics en fetge tant d'Sp1 com de les formes precursors i madura d'SREBP-1. Aquests resultats ens van conduir a estudiar la seva implicació en la transactivació de *GCK* mediada per insulina d'orada. La transfecció transitòria de cèl·lules HepG2 amb els constructes reporters que contenen diferents fragments del promotor de *GCK*, juntament amb els plasmidis d'expressió que codifiquen per a SREBP-1a i Sp1 ens ha permès observar que l'activació d'ambdós factors de transcripció sobre el promotor de *GCK* és additiva. La falta de sinergisme entre SREBP-1a i Sp1 suggereix que la transactivació del promotor de *GCK* succeeix a través de mecanismes d'acció independents.

Experiments de transfecció transitòria amb cèl·lules HepG2 mostren que la insulina transactiva el promotor de *GCK*. La incubació amb insulina de cèl·lules HepG2 transfectades amb el plasmidi d'expressió per a Sp1 i un constructe reporter amb el promotor de *GCK*, causa un increment de l'efecte activador produït per Sp1. Pel contrari, en el cas de cotransfectar les cèl·lules amb el plasmidi d'expressió per a SREBP-1a, no s'observa efecte inductor d'insulina en l'activació de *GCK* produïda per SREBP-1a. Aquests resultats, suggereixen que Sp1, a través de la unió a la caixa Sp situada entre les posicions -53 a -44 en relació a l'inici de transcripció, podria actuar com a mediador de l'acció activadora de la insulina sobre el promotor de *GCK* d'orada.

Per tal de verificar aquesta hipòtesi vàrem analitzar l'efecte de la insulina sobre el constructe que conté el promotor de *GCK* amb la caixa Sp mutada. Així mateix es va analitzar

l'efecte de la insulina sobre el constructe del promotor amb la caixa SRE mutada. Quan la caixa Sp està mutada, la insulina no pot dur a terme l'activació transcripcional del promotor de *GCK*. Pel contrari, la insulina és capaç d'activar la transcripció de *GCK* independentment de què la caixa SRE estigui o no mutada. Així, els resultats obtinguts indiquen que SREBP-1a no és necessari per a l'activació transcripcional de *GCK* per insulina. En concordança amb els nostres resultats, experiments recents efectuats amb cultiu d'hepatòcits de rata deficientes en SREBP-1, mostren que la inducció de l'expressió del gen *GCK* per insulina pot produir-se en absència de la forma madura nuclear d'SREBP-1 (Gregori i col·l, 2006). Hansmannel i col·l (2006) també observen que SREBP-1 no és un factor crític en la regulació de *GCK* per insulina. En la mateixa línia, la utilització d'un agonista que promou el processament d'SREBP-1c no afecta a l'expressió de *GCK*. Altres estudis descarten també la implicació d'SREBP-1 en l'activació de *GCK* per insulina (Ribaux i col·l, 2003; Stoeckman i col·l, 2002; Matsuzaka i col·l, 2004). Matsuzaka i col·l (2004) demostren que l'expressió d'SREBP-1c pot ser incrementada per realimentació en absència d'insulina, suggerint que la inducció d'SREBP-1c és independent de la insulina.

Els experiments presentats en aquesta memòria posen de manifest que SREBP-1a actua com a activador transcripcional de *GCK* de fetge d'orada, però, en canvi, no sembla actuar com a mediador directe de l'acció de la insulina. La insulina promou l'activació del promotor de *GCK*, però en mutar la caixa Sp, la insulina no pot dur a terme l'efecte estimulador. Per tant, en base als nostres resultats hipotetitzem un model en què Sp1 tindria un paper important en la mediació de l'acció inductora de la insulina sobre la transcripció de *GCK* en orada (figura 44).



5. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS:

1) L'administració intraperitoneal d'insulina i glucosa a orades condueix a un increment dels nivells hepàtics d'mRNA de *GCK*.

2) A baixa concentració de glucosa, la *GCK* col·localitza en el nucli de cèl·lules CHO amb la GGRP de rata. En presència de concentració elevada de glucosa ambdós proteïnes es localitzen en el citoplasma.

3) Experiments de transcripció/traducció *in vitro* mostren que el primer codó AUG de la seqüència d'mRNA que codifica per a la *GCK* d'orada dirigeix la traducció d'una proteïna de 54 kDa. Quan el primer AUG està mutat, el tercer AUG de la seqüència genera una proteïna truncada.

4) Mitjançant la tècnica del passeig cromosòmic, s'han clonat 1397 pb adjacents a l'extrem 5' del cDNA de la *GCK* hepàtica d'orada. Aquest fragment mostra activitat promotora.

5) L'inici de transcripció està situat 98 nucleòtids corrent amunt respecte el codó iniciador de la traducció. La regió situada entre els pb -288 i -21 respecte l'inici de transcripció del promotor de la *GCK* és essencial per a la transcripció basal del gen que codifica per a la *GCK* d'orada.

6) SREBP-1a té un paper important en la regulació de gens implicats en la glucòlisi/gluconeogènesi en fetge d'orada: indueix l'activitat promotora de la *GCK*, a través de la unió a la regió situada entre els pb -105 i -95 en relació a l'inici de transcripció; i indueix l'activitat promotora de la *PFKFB1*, a través de la unió als nucleòtids situats entre -56 i -48 pb en relació a l'inici de transcripció.

7) Els nivells proteics de les formes precursora i madura d'SREBP-1 incrementen en fetge en realimentar orades en situació de dejuni. El tractament de les orades amb glucosa o insulina promou un increment en els nivells proteics d'SREBP-1 a nivell de les formes precursora i madura.

8) Sp1 transactiva el promotor de la *GCK* hepàtica d'orada a través de la unió als pb -53/-44 en relació a l'inici de transcripció. Per si sol, Sp3 no produeix cap efecte sobre l'activitat transcripcional del promotor de la *GCK*, però en presència d'Sp1 actua reprimint l'activació produïda per aquest factor. Sp1 i Sp3 competeixen pel mateix lloc d'unió al promotor de *GCK* d'orada.

9) Els nivells d'Sp1 incrementen en fetge d'orades tractades amb insulina, mentre que Sp3 resta invariable.

10) En cèl·lules HepG2, la insulina exerceix un efecte activador sobre el promotor de la *GCK* de fetge d'orada. L'efecte activador desapareix quan s'utilitzen constructes reporters del promotor amb la caixa d'unió a Sp1 mutada. La utilització de constructes reporters amb la caixa d'unió a SREBP-1a mutada no afecta a l'activació per insulina.

6. BIBLIOGRAFIA

A

- Abad M.E., Agulleiro B., Rombout J.H.W.M.** (1986). An immunocytochemical and ultrastructural study of the endocrine pancreas of *Sparus aurata* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64: 1-12.
- Adams C.M., Goldstein J.L., Brown M.S.** (2003). Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100 (19): 10647-52.
- Agius L.** (1998). The physiological role of glucokinase binding and translocation in hepatocytes. *Advan. Enzyme Regul.* 38: 303-331.
- Agius L., Peak M.** (1993). Intracellular binding of glucokinase in hepatocytes and translocation by glucose, fructose and insulin. *Biochem J.* 296: 785-796.
- Agius L., Peak M., Van Schaftingen E.** (1995). The regulatory protein of glucokinase binds to the hepatocyte matrix, but, unlike glucokinase, does not translocate during substrate stimulation. *Biochem. J.* 309: 711-713.
- Agius L., Peak M., Newgard C.B., Gómez-Foix A.M., Guinovart J.J.** (1996). Evidence for a role of glucose-induced translocation of glucokinase in the control of hepatic glycogen synthesis. *J. Biol. Chem.* 271: 30479-30486.
- Agius L., 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: 413-421.
- Algaier J., Uyeda K.** (1988) Molecular cloning, sequence analysis and expression of a human liver cDNA coding for fructose-6-P, 2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 328-333.
- Alroy I., Sousson L., Seger R., Yarden Y.** (1999). New differentiation factor stimulates phosphorylation and activation of Sp1 transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1961-1972.
- Alvarez E., Roncero I., Chowen J.A., Vazquez P., Blazquez E.** (2002). Evidence that glucokinase regulatory protein is expressed and interacts with glucokinase in rat brain. *J. Neurochem.* 80: 45-53.
- Amemiya-Kudo M., Shimano H., Yoshikawa T., Yahagi N., Hastly A.H., Okazaki H., Tamura Y., Shionoiri F., Iizuka Y., Ohashi K., Osuga J., Harada K., Gotoda T., Sato R., Kimura S., Ishibashi S., Yamada N.** (2000). Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene. *J. Biol. Chem.* 275 (40): 31078-85.
- Amemiya-Kudo M., Shimano H., Hastly A.H., Yahagi N., Yoshikawa T., Matsuzaka T., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Ohashi K., Osuga J., Harada K., Gotoda T., Sato R., Kimura S, Ishibashi S., Yamada N.** (2002). Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J. Lipid Res.* 43 (8): 1220-35.
- Ammanamanchi S., Freeman J.W., Brattain M.G.** (2003). Acetylated Sp3 is a transcriptional repressor of transforming growth factor-beta receptors. *J. Biol. Chem.* 276: 3348-3352.
- Andreone T.L., Printz R.L., Pilkis S.J., Magnuson M.A., Granner D.K.** (1989). The amino acid sequence of rat liver glucokinase deduced from cloned cDNA. *J. Biol. Chem.* 264: 363-369.
- Arden C., Harbottle A., Baltrusch S., Tiedge M., Agius L.** (2004). Glucokinase is an integral component of the insulin granules in glucose-responsive insulin secretory cells and does not translocate during glucose stimulation. *Diabetes.* 53: 1346-1351.
- Arden C., Baltrusch S., Agius L.** (2006). Glucokinase regulatory protein is associated with mitochondria in hepatocytes. *FEBS Letters.* 580: 2065-2070.

Argaud D., Zhang Q., Pan W, Maitra S., Pilkis S.J., Lange A.J. (1996). Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states. Gene structure and 5'-flanking sequence. *Diabetes*. 45: 1563-1571.

Armstrong S.A., Barry D.A., Leggett R.W. i Mueller C.R. (1997). Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C-terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 272: 13489-13495.

Athanikar J.N., Sanchez H.B., Osborne T.F. (1997). Promoter selective transcriptional synergy mediated by sterol regulatory element binding protein and Sp1: a critical role for Btd domain of Sp1. *Mol Cell. Biol.* 17: 5193-5200.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., David M.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (2005). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New jersey, USA.

Azzout-Marniche D., Becard D., Guichard C., Foretz M., Ferre P., Foufelle F. (2000). Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 350 (2): 389-93.

B

Baanante I.V., García de Frutos P., Bonamusa L., Fernández F. (1991). Regulation of fish glycolysis-gluconeogenesis. Role of fructose-2,6P₂ and PFK-2. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B: 11-17.

Bakovic M., Waite K., Vance D.E. (2003). Oncogenic Ha-Ras transformation modulates the transcription of the CTP: phosphocholine cytidyltransferase alpha gene via p42/44MAPK and transcription factor Sp3. *J. Biol. Chem.* 278: 14753-14761.

Bali D., Svetlanov A., Lee H-W., Fusco-DeMane D., Leiser M., Li B., Barzilai N., Surana M., Hou H., Fleischer N., DePinho R., Rossetti L., Efrat S. (1995) Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of mouse glucokinase gene. *J. Biol. Chem.* 270: 21464-21467.

Baltrusch S., Lenzen S., Okar D.A., Lange A. J., Tiedge M. (2001). Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase as a novel interaction partner. *J. Biol. Chem.* 276: 43915-43923.

Baltrusch S., Francini F., Lenzen S., Tiedge M. (2005). Interaction of glucokinase with the liver regulatory protein is conferred by leucine-asparagine motifs of the enzyme. *Diabetes*. 54: 2829-2837.

Banfi C., Eriksson P., Giandomenico G., Mussoni L., Sironi L., Hamsten A., Tremoli E. (2001). Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 gene by insulin: insights into the signaling pathway. *Diabetes*. 50(7):1522-30.

Baños N., Baró J., Castejón C., Navarro I., Gutiérrez J. (1998). Influence of high-carbohydrate enriched diets on plasma insulin levels and insulin and IGF-I receptors in trout. *Regul Pept.* 77: 55-62.

Barroso I., Santisteban P. (1999). Insulin-induced early growth response gene (Egr-1) mediates a short term expression of rat malic enzyme gene transcription. *J. Biol. Chem.* 274: 17997-18004.

Barzilai N., Rossetti L. (1993). Role of glucokinase and glucose-6-phosphatase in the acute and chronic regulation of hepatic glucose fluxes by insulin. *J. Biol. Chem.* 268, 25019-25025.

Batra R. S., Brown R., Brown G.K., Craig I.W. (1996). Molecular cloning and tissue-specific expression of mouse kidney 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase. *FEBS Lett.* 393: 167-173.

Baudler M., Duschl J, Winkler C., Scharfl M., Altschmied J. (1997). Activation of transcription of the melanoma inducing Xmrk oncogene by GC box element. *J. Biol. Chem.* 272: 131-137.

- BeCARD D., Hainault I., Azzout-Marniche D., Bertry-Coussot L., Ferre P., Fougelle F.** (2001). Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimic insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice. *Diabetes*, 50: 2425-30.
- Becker T.C., Noel R.J., Johnson J.H., Lynch R. M., Hirose H., Tokuyama Y., Bell G. I., Newgard C.B.** (1996). Differential effects of overexpressed glucokinase and hexokinase I in isolated islets. *J. Biol. Chem.* 271: 390-394.
- Bedoya F.J., Ramirez R., Goberna R.** (1984). The effect of different kinds of refeeding on islet glucose phosphorylating activities. *Metabolism*. 33: 1097-1101.
- Bedoya F.J., Matschinsky F.M., Shimizu T., O'Neil J.J., Appel M.C.** (1986) Differential regulation of glucokinase activity in pancreatic islets and liver of the rat. *J. Biol. Chem.* 261: 10760-10764.
- Bell G.I., Cuesta-Muñoz, A., Matschinsky F.M.** (2002). in *Enciclopedia Molecular Medicine*. 1437-1442, John Wiley & Sons, New York.
- Bendall, A.J., Molloy, P.L.** (1994) Base preferences for DNA binding by the bHLPL-Zip protein USF: effects of MgCl₂ on specificity and comparison with binding of Myc family members. *Nucleic Acids Res.* 22(14): 2801-2810.
- Berradi H., Taouis M., Cassy S., Rideau N.** (2005). Glucokinase in chicken (*Gallus gallus*). Partial cDNA cloning, immunodetection and activity determination. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 141(2):129-39.
- Bigger C.B., Melnikova I.N., Gardner P.D.** (1997). Sp1 and Sp3 regulate expression of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta4 subunit gene. *J. Biol. Chem.* 272: 25976-25982.
- Birnbaum M.J., van Wijnen A. J., Odgren P.R., Last T.J., Suske G., Stein G.S., Stein J.L.** (1995). Sp1 transactivation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochem.* 34: 16503-16508.
- Black A.R., Jemsen D., Lin S.Y., Azizkhan J.C.** (1999). Growth/cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274: 1207-1215.
- Blasco J., Fernández-Borrás J., Marimon I., Requena A.** (1996). Plasma glucose kinetics and tissue uptake in brown trout in vivo: effect of an intravascular glucose load. *J. Comp Physiol B.* 165: 534-541.
- Blockehurst K., Payne V., Davies R., Carroll D., Vertigan H.L. Wightman H., Ainston S., Waddell I.D., Leighton B., Coghlan M.P., Agius L.** (2004). Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule of glucokinase activators. *Diabetes.* 53: 535-541.
- Bois-Joyeux B., Chanez M., Azzout B., Peret J.** (1986). Studies on the early changes in rat hepatic fructose 2,6-bisphosphatase and enzymes in response to a high protein diet. *J. Nutr.* 116: 446-454.
- Bonamusa L., García de Frutos P., Fernández F., Baananate I. V.** (1992). Nutritional effects on key glycolytic-gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Sparus aurata*. *Mol. Mar. Biol.* 1(2): 113-125.
- Borellini F., Aquino A., Josephs S. F., Glazer R.I.** (1990). Increased expression and DNA-binding activity of transcription factor Sp1 in doxorubicin-resistant HL-60 leukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5541-5547.
- Borrebaek B., Waagbo R., Christophersen B., Tranulis M., Hemre G-I.** (1993). Adaptable hexokinase with low affinity for glucose in the liver of atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 833-836.
- Borrebaek B., Christophersen B.** (2000). Hepatic glucose phosphorylating activities in perch (*Perca fluviatilis*) after different dietary treatments. *Comp. Biochem. Physiol.* 125B: 387-393.

- Bosco D., Meda P., Iynedjian P.B.** (2000). Glucokinase and glucokinase regulatory protein: mutual dependence for nuclear localization. *Biochem J.* 348: 215-222.
- Bossard P., Decaux J-F., Juanes M., Girard J.** (1994). Initial expression of glucokinase gene in cultured hepatocytes from suckling rats is linked to the synthesis of an insulin-dependent protein. *Eur. J. Biochem.* 223: 371-380.
- Bouwman P., Gollner H., Elsasser H.P., Eckhoff G., Karis A., Grosveld F., Philipsen S., Suske G.** (2000). Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *EMBO J.* 19: 655-661.
- Bouwman P., Philipsen S.** (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1995: 27-38.
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brandeis M., Frank D., Keshet I., Siegfried Z., Mendelsohn M., Nemes A., Temper V., Razin A., Cedar H.** (1994). Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature.* 371: 435-438.
- Braun H., Koop R., Ertmer A., Nacht S., Suske G.** (2001). Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation. *Nucleic Acids Res.* 29: 4994-5000.
- Brooks S.P., Lampi B.J.** (1997). Time course of enzyme changes after a switch from a high-fat to a low-fat diet. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 118(2): 359-65.
- Brown D.D., Wang Z., Furlow J.D., Kanamori A., Schwartzman R.A., Remo B.F., Pinder A.** (1996). The thyroid hormone-induced tail resorption during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 1924-1929.
- Brown K.S., Kalinowski S.S., Megill J.R., Durham S.K., Mookthiar K.A.** (1997). Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus. *Diabetes* 46: 1779-1786.
- Brown M.S, Goldstein J.L.** (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96 (20): 11041-8. Review.
- Bruni P., Vandoolaeghe P., Rosseau G., HueL., Rider M.H.** (1999). Expression and regulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase isoenzymes in white adipose tissues. *Eur. J. Biochem.* 259: 756-761.
- Burant C.F., Sivitz W.I., Fukumoto H., Kayano T., Nagamatsu S., Seino S., Pessin J.E., Bell G.I.** (1991). Mammalian glucose transporters: structure and molecular regulation. *Recent. Prog. Horm. Res.* 47:349-87.
- Burke C.V., Buettger C.W., Davis E.A., McClane S.J., Matschinsky F.M., Raper S.E.** (1999). Cell-biological assessment of human glucokinase mutants causing maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY 2) or glucokinase-linked hyperinsulinaemia (GK-HI). *Biochem. J.* 342: 345-352.
- Bustamante E., Padiaditakis P., He L., Lemasters J.J.** (2005). Isolated mouse liver mitochondria are devoid of glucokinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 334(3):907-10.

C

- Cabrera-Valladares G., German M.S., Matschinsky F.M., Wang J., Fernandez-Mejia C.** (1999). Effect of retinoic acid on glucokinase activity and gene expression and on insulin secretion in primary cultures of pancreatic islets. *Endocrinology.* 140(7):3091-6.
- Cabreva-Valldares G., Matschinsky F.M., Wang J., Fernández-Mejía C.** (2001). Effect of retinoic acid on glucokinase activity and gene expression in neonatal and adult cultured hepatocytes. *Life Sci.* 68: 2813-24.

- Cagen L.M., Deng X., Wilcox H.G., Park E.A., Raghov R., Elam M.B.** (2005). Insulin activates the rat sterol-regulatory-element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp1 and NFY *cis*-acting elements. *Biochem. J.* 385: 207-216.
- Capilla E., Médale F., Navarro I., Panserat S., Vachot C., Kaushik S., Gutiérrez J.** (2003). Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout. *Regul Pept.* 110:123-132.
- Capilla E., Díaz M., Albalat A., Navarro I., Pessin J.E., Keller K., Planas J.V.** (2004). Functional characterization of an insulin glucose transporter (GLUT4) from fish adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287: 348-357.
- Cárdenas M.L.** (1995). Glucokinase: its regulation and role in liver metabolism, R. G. Landes Co, Austin.
- Carmona A., Nishina P.M., Avery E.H., Freedland R.A.** (1991). Time course changes in glycogen accretion, 6-phosphogluconate, fructose-2,6-bisphosphate, and lipogenesis upon refeeding a high sucrose diet to starved rats. *Int. J. Biochem.* 23(4): 455-60.
- Carneiro N.M, Navarro I., Gutiérrez J., Plisetskaya E.M.** (1993) Hepatic extraction of circulating insulin and glucagon in brown trout (*Salmo trutta fario*) after glucose and arginine injection. *J. Exp. Zool.* 267: 416-422. *Cell.* 90: 967-970.
- Caseras A.** (2000). Caracterització molecular de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa, glucoquinasa, i subunitat catalítica de la glucosa-6-fosfatasa de fetge d'orada (*Sparus aurata*); Regulació nutricional de l'expressió de glucoquinasa i glucosa-6-fosfatasa. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- Caseras A., Metón I., Fernandez F., Baanante I.V.** (2000) Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream, (*Sparus aurata*). *Biochim. Biophys. Acta.* 1493, 135-141.
- Caseras A., Metón I., Vives C., Egea M., Fernández F., i Baanante I.V.** (2002) Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br. J. Nutr.* 88: 607-614.
- Castoldi M., Chu M.L.** (2002). Structural and functional characterization of the human and mouse fibulin-1 gene promoters: role of Sp1 and Sp3. *Biochem J.* 362 (Pt 1): 41-50.
- Chakrabarti S.K., James J.C., Mirmira R.G.** (2002). Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor, Pdx1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding. *J. Biol. Chem.* 277(15):13286-93.
- Chakravarty K., Wu S.Y., Chiang C.M., Samols D., 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 (15): 15385-95.
- Chauhan J, Dakshinamurti K.** (1991). Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem.* 266(16):10035-8.
- Chen G., Liang G., Ou J., Goldstein J.L., 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. USA.* 101, 31: 11245-11250.
- Cheng X., Hart G.W.** (2001). Alternative O-glicosilation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J. Biol. Chem.* 276: 10570-10575.
- Chiang C M., Roeder R. G.** (1995). Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science.* 267: 531-536.

Christesen H.B., Jacobsen B.B., Odili S., Buettger C., Cuesta-Munoz A., Hansen T., Brusgaard K., Massa O., Magnuson M.A., Shiota C., Matschinsky F.M., Barbetti F. (2002). The second activating glucokinase mutation (A456V): implications for glucose homeostasis and diabetes therapy. *Diabetes*. 51(4):1240-6.

Christiansen D.G., Klungsoyr L. (1987) Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B: 701-711.

Chu S., Ferro T.J. (2005). Sp1: Regulation of gene expression by phosphorylation. Review. *Gene*. 348: 1-11.

Cissell M.A., Zhao L., Sussel L., Henderson E., Stein R. (2003). Transcription factor occupancy of the insulin gene in vivo. Evidence for direct regulation by Nkx2.2. *J Biol. Chem.* 278(2):751-756.

Clark D.G., Filseel O.H., 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.

Colosia A.D., Marker A.J., Lange A.J., El-Maghrabi M.R., Granner D.K., Tauler A., Pilkis J., Pilkis S.J. (1988). Induction of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA by refeeding and insulin. *J. Biol. Chem.* 263: 18669-18677.

Comer F., Hart G.W. (2000). O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J. Biol. Chem.* 275: 29179-29182.

Courey A.J., Tjian R. (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell*. 55: 887-898.

Courey A.J., Holtzman D. A., Jackson S.P., Tjian R. (1989). Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell*. 59: 827-836.

Cowey, C.B., Higuera, M., Adron, J.W. (1977) The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* 38: 385-395.

Cowey C. B., Walton M. J. (1989) *Fish nutrition* (ed. Halver, J. E.). Academic Press. San Diego.

Crépin K.M., Darville M.I., Hue L., Rousseau G.G. (1988) Starvation or diabetes decreases the content but not the mRNA of 6-phosphofructo-2-kinase in rat liver. *FEBS Lett.* 227: 136-140.

D

Dakshinamurti K., Cheah-Tan C. (1968a). Liver glucokinase of the biotin deficient rat. *Can J Biochem.* 1968 Jan;46(1):75-80.

Dakshinamurti K., Cheah-Tan C. (1968b). Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Arch Biochem Biophys.* 127(1):17-21.

Dakshinamurti K. (2005) Biotin- a regulator of gene expression. *J. Nutr. Biochem.* 16: 419-423.

Danial N.N, Gramm C.F., Sorzano L., Zhang Y, Krauss S., Ranger A.M., Datta S.R., Greenberg M.E., Liklider L.J., Lowell B.B., Gygi S.P., Korsmeyer S.J. (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*. 424: 952-956.

Daniel S., Zhang S., DePaoli-Roach A., Kim K.H. (1996a). Dephosphorylation of Sp1 by a protein phosphatase 1 is involved in the glucose-mediated activation of the acetyl-CoA carboxylase gene. *J. Biol. Chem.* 271: 14692-14697.

Daniel S., Kim K-H. (1996b). Sp1 mediates glucose activation of the acetyl-coA carboxilase promoter. *J. Biol. Chem.* 271: 1385-1392.

- Darville M.I., Crépin K.M., Vandekerekhove J., Van Damme J., Octave J.N., Rider M.H., Marchand M. J., Hue L., Rousseau G.G.** (1987). Complete nucleotide sequence coding for rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase derived from a cDNA clone. *FEBS Lett.* 224: 317-321.
- Darville M.I., Crépin K.M., Hue L., Rousseau G.G.** (1989). 5'-flanking sequence and structure of the gene encoding rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6543-6547.
- Darville M I., Chikri M., Lebeau E., Hue L., Rousseau, G.G.** (1991) A rat gene encoding heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.* 288: 91-94.
- Datta P.K., Raychaudhuri P., Bagchi S.** (1995). Association of p107 with Sp1: genetically separable regions of p107 are involved in regulation of E2F- and Sp1-dependent transcription. *Mol. Cell. Biol.* 15: 5444-5452.
- Datta S., Osborne T.F.** (2004). Activation domains from both monomers contribute to transcriptional stimulation by sterol regulatory element-binding protein dimers. *J. Biol. Chem.* 280 (5): 3338-45.
- Davenport J., Black K., Burnell G., Cross T., Culloty S., Ekaratne S., Furness B., Mulcahy M., Thetmeyer H.** (2003). Aquaculture: The ecological issues. *British Ecological Society.* Blackwell Pub., Malden.
- Davis E.A., Cuesta-Muñoz A., Raoul M., Buettger C., Sweet I., Moates M., Magnuson M.A.** (1999). Mutants of glucokinase cause hypoglycaemia- and hyperglycaemia syndromes and their analysis illuminates fundamental quantitative concepts of glucose homeostasis. *Diabetologia.* 42: 1175-1186.
- DeBose-Boyd R.A., Brown M.S., Li W.P., Nohturfft A., Goldstein J.L., Espenshade P.J.** (1999). Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell.* 99 (7): 703-12.
- Decaux J.F., Antoine B., 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(20):11584-90.
- Decaux J.F., Juanes M., Bossard P., Girard J.** (1997). Effects of triiodothyronine and retinoic acid on glucokinase gene expression in neonatal rat hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 130(1-2):61-7.
- De la Iglesia N., Veiga-da-Cunha M., Van Schaftingen E., Guinovart J.J., Ferrer J.C.** (1999). Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localization of liver glucokinase in rat. *FEBS Lett.* 456: 332-338.
- De la Iglesia N., Mukhtar M., Seoane J., Guinovart J.J., 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.
- De Luca P., Majello B., Lania L.** (1996). Sp3 represses transcription when tethered to promoter DNA or targeted to promoter proximal RNA. *J. Biol. Chem.* 271: 8533-8536.
- Deng X., Cagen L.M., Wilcox H.G., Park E.A., Raghov R., Elam M.B.** (2002). Regulation of the rat SREBP-1c promoter in primary rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (1): 256-62.
- Dennig J., Hagen G., Beato M., Suske G.** (1995). Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter. *J. Biol. Chem.* 270 (21): 12737-44.
- Dennig J., Beato M, Suske G.** (1996). An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *EMBO J.* 15: 5659-5667.
- Detheux M., Vandercammen A., Van Schaftingen E.** (1991). Effectors of the regulatory protein acting on rat liver glucokinase: a kinetic investigation. *Eur. J. Biochem.* 200: 553-561

Ding H., Benotmane A.M., Suske G., Collen D., Belayew A. (1999). Functional interactions between Sp1 or Sp3 and the helicase-like transcription factor mediate basal expression from the human plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J. Biol. Chem.* 274: 19573-19580.

DiPietro D. L., Weinhouse S. (1960) Hepatic glucokinase in the fed, fasted and alloxan-diabetic rat. *J. Biol. Chem.* 235: 2542-2545.

Discher D.J., Bishopric N.H., Wu X., Peterson C.A., Webster K.A. (1998). Hypoxia regulates beta-ennolase and pyruvate kinase-M promoters by modulating Sp1/Sp3 binding to a conserved GC element. *J. Biol. Chem.* 273: 26087-26093.

Doetzlhofer A., Rotheneder H., Lagger G., Koranda M., Kurtev V., Brosch G., Wintersberger E., Seiser C. (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell. Biol.* 19: 5504-5511.

Ducluzeau P.H., Perretti N., Laville M., Andreelli F., Vega N., Riou J.P., Vidal H. (2001). Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes.* 50 (5): 1134-42.

Dunaway, G. A., Leung, G. L-Y., Trasher, J. R., Cooper, M. D. (1978). Turnover of hepatic phosphofructokinase in normal and diabetic rats. *J. Biol. Chem.* 253: 7460-7463.

Dupriez V.J., Rousseau G.G. (1997). Glucose response elements in a gene that codes for 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *DNA Cell Biol.* 16: 1075-85.

Dynan W.S., Tijan R. (1983a). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell.* 35: 79-87

Dynan W.S., Tijan R. (1983b). Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell.* 32: 669-680

E

Eberlé D., Hegarty B., Bossard P., Ferré P., Foufelle F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 86 (11): 839-48.

Efanov A.M., Barrett D.G., Brenner M.B., Briggs S.L., Delaunois A., Durbin J.D., Giese U., Guo H., Radloff M., Gil G.S., Sewing S., Wang Y., Weichert A., Zaliani A., Gromada J. (2005). A novel glucokinase activator modulates pancreatic islet and hepatocyte function. *Endocrinology.* 146(9):3696-701.

Efrat S., Leiser M., Wu Y.J., Fusco-DeMane D., Emran O.A., Surana M., Jetton T.L., Magnuson M.A., Weir G., Fleischer N. (1994a). Ribozyme-mediated attenuation of pancreatic beta-cell glucokinase expression in transgenic mice results in impaired glucose-induced insulin secretion. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 2051-2055.

Efrat S., Tal M., Lodish H.F. (1994b). The pancreatic beta-cell glucose sensor. *Trends Biochem. Sci.*19: 535-538

El-Maghrabi M.R., Lange A. J., Tauler A., Kummel, L., Pilkis, S.J. (1991). The rat fructose-1,6-bisphosphatase gene. *J. Biol. Chem.* 266: 2115-2120.

Emili A., Greenblatt J., Ingles C.J. (1994). Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1582-1593.

Engelking L.J., Kuriyama H., Hammer R.E., Horton J.D., Brown M.S., Goldstein J.L., Liang G. (2004). Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. *J. Clin. Invest.* 113 (8): 1168-75.

Ericsson J., Edwards P.A. (1998). CBP is required for sterol-regulated and sterol regulatory element-binding protein-regulated transcription. *J. Biol. Chem.* 273 (28): 17865-70.

Espenshade P.J., Cheng D., Goldstein J.L., Brown M.S. (1999). Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 274 (32): 22795-804.

F

Fajan S.S., Bell G.I., Polonsky K.S. (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N. Engl. J. Med.* 345: 971-980.

Farrelly D., Brown K.S., Tieman A., Ren J., Lira S.A., Hagan D., Gregg R., Mookhtiar K. A., Hariharan N. (1999). Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: a sequestration mechanism in metabolic regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14511-14516.

Felder T.K., Klein K., Patsch W., Oberkofler H. (2005). A novel SREBP-1 splice variant: tissue abundance and transactivation potency. *Biochim. Biophys. Acta.* 1731(1):41-7.

Felig, P. (1973). The glucose-alanine cycle. *Metabolism.* 22: 179-207.

Fernandez-Mejia C., Vega-Allende J., Rojas-Ochoa A., Rodriguez-Dorantes M., Romero-Navarro G., Matschinsky F.M., Wang J., German M.S. (2001). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate increases pancreatic glucokinase activity and gene expression. *Endocrinology.* 142(4):1448-52.

Fernandez-Mejia C., Davidson M.B. (1992). Regulation of glucokinase and proinsulin gene expression and insulin secretion in RIN-m5F cells by dexamethasone, retinoic acid, and thyroid hormone. *Endocrinology.* 130(3):1660-8.

Fernández F., Miquel A.G., Córdoba M., Varas M., Metón I., Caseras A, Baanante I.V. (2007). Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 343: 1-10.

Fernández-Novell J.M., Castel S., Bellido D., Ferrer J.C., Vilaró S., Guinovart J.J. (1999). Intracellular distribution of hepatic glucokinase and glucokinase regulatory protein during fasted to refeed transition in rats. *FEBS Letters.* 459: 211-214.

Ferre T., Riu E., Bosch F., Valera A. (1996a). Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB J.* 10: 1213-1218.

Ferre T., Pujol A., Riu E., Bosch F., Valera A. (1996b). Correction of diabetic alterations by gluokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7225-7230.

Fideu M.D., Soler G., Ruiz-Amil M. (1983) Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (Salmon gairdneri R.). *Comp. Biochem. Physiol.* 74B: 795-799.

Fillat C., Gomez-Foix A.M., Guinovart J.J. (1993). Stimulation of glucose utilization by fructose in isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys.* 300(2):564-9.

Foretz M., Guichard C., Ferré P., Fofelle F. (1999a). 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. USA.* 96: 12737-12742.

Foretz M., Pacot C., Dugail I., Lemarchand P., Guichard C., Le Liepvre X., Berthelie-Lubrano C., Spiegelman B., Kim J. B. Ferre P., Fofelle F. (1999b) ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3760-3768.

Foti D., Iuliano R., Chiefari E., Brunetti A. (2003). A nucleoprotein complex containing Sp1, C/EBP β , and HMGI-Y controls human insulin receptor gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 23: 2720-2732.

French C. J., Hochachka P. W., Mommsen T. P. (1983). Metabolic organization in liver during spawning migration of sockeye salmon. *Am. J. Physiol.* 245: R827-R830.

Froguel P., Vaxillaire M., Sun F., Velho G., Zouali H., Butel M. O., Lesage F., Vionnet N., Clément K., Fougèrouse F., Tanizawa Y., Weissenbach J., Beckmann J.S., Lathrop G.M., Passa P., Permutt M.A., Cohen D. (1992). Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature.* 356: 162-164.

Frohmann M.A., Dush M.K., Martin G.R. (1989). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 23:8998-9002.

Fuirichi M., Yone Y. (1981). Changes of blood sugar and plasma insulin levels of fishes in glucose tolerance test. *Bull Jpn Soc Sci Fish.* 47: 761-764.

Fujimoto Y., Donahue E.P., Shiota M. (2004). Defect in glucokinase translocation in Zucker diabetic fatty rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287: E414-423.

Fukada H., Iritani N., Noguchi T. (1997). Transcriptional regulatory regions for expression of the rat fatty acid synthase. *FEBS Letters.* 406: 243-248.

Futamura M., Hosaka H., Kadotani A., Shimazaki H., Sasaki K., Ohyama S., Nishimura T., Eiki J., Nagata Y. (2006). An allosteric activator of glucokinase impairs the interaction of glucokinase and glucokinase regulatory protein and regulates glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 281(49):37668-74.

G

Galan M., Vincent O., Roncero I., Azriel S., Boix-Pallares P., Delgado-Alvarez E., Diaz-Cadorniga F., Blázquez E., Navas M.A. (2006). Effects of novel maturity-onset diabetes of young (MODY)-associated mutations on glucokinase activity and protein stability. *Biochem J.* 393: 389-396.

García-Flores M., Blázquez E., Zueco J.A. (2001). Effects of triiodothyronine and bovine growth hormone on glucose transporter isoform-2 (GLUT-2) and glucokinase (GK) gene expression in pancreatic islets of fetal and adult rats. *Pflugers Arch.* 442(5):662-7.

García de Frutos, P., Bonamusa, L., Fernández, F., Baanante, I.V. (1990). Fructose-2,6-bisphosphate in liver of *Sparus aurata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 96B: 63-65.

García de Frutos, P., Baanante, I.V. (1994). 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in liver of the teleost fish *Sparus aurata*. *Arch. Bioch. Biophys.* 308: 461-468.

García de Frutos P., Baanante I.V. (1995). The muscle isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase of the teleost *Sparus aurata*: relationship with the liver isoform. *Arch. Bioch. Biophys.* 321: 297-302.

García-Herrero C.M., Galán M., Vincent O., Flández B., Gargallo M., Delgado-Alvarez, Blázquez E., Navas M.A. (2007). Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity. *Diabetologia.* 50: 325-333.

Ge Y., Jensen T.L., Matherly L.H., Taub J.W. (2002). Synergistic regulation of human cystathionine-beta-synthase-1b promoter by transcription factors NF-YA isoforms and Sp1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1579: 73-80.

- German M.S.** (1993) Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 1781-1785.
- Gidh-Jain M., Takeda J., Xu L. Z., Lange A.J., Vionnet N., Stoffel M., Froguel P., Velho G., Sun F., Cohen D., Patel P., Lo Y.M. D., Hattersley A. T., Luthman H., Wedell A., St. Charles R., Harrison R.W., Weber I. T., Bell G.I., Pilkis S.J.** (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. USA.* 90: 1932-1936.
- Gidoni D., Dynan W.S., Tjian R.** (1984). Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoter. *Nature.* 312 (5993): 409-13.
- Gidoni D., Kadonaga J.T., Barrera-Saldana H., Takahashi K., Chambon P., Tjian R.** (1985). Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions. *Science.* 230(4725):511-7.
- Gill G., Pascal E., Tseng Z.H., Tjian R.** (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAF_{II}110 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl.Acad. Sci. USA.* 91: 192-196.
- Girard J., Ferre P., Foufelle F.** (1997). Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu. Rev. Nutr.* 17: 325-52. Review.
- Glaser B., Kesavan P., Heyman M., Davis E., Cuesta A., Buchs A., Stanley C.A., Thornton P.S., Permutt M.A., Matschinsky F.M., Herold K.C.** (1998). Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N. Engl. J. Med.* 338(4):226-30.
- Gloyn A.L., Noordam K., Willemsen M.A., Ellard S., Lam W.W., Campbell I.W., Midgley P., Shiota C., Buettger C., Magnuson M.A., Matschinsky F.M., Hattersley A.T.** (2003). Insights into the biochemical and genetic basis of glucokinase activation from naturally occurring hypoglycemia mutations. *Diabetes.* 52(9):2433-40
- Gloyn A.L., Odili S., Zelent D., Buettger C., Castleden H.A., Steele A.M., Stride A., Shiota C., Magnuson M.A., Lorini R., d'Annunzio G., Stanley C.A., Kwagh J., van Schaftingen E., Veiga-da-Cunha M., Barbetti F., Dunten P., Han Y., Grimsby J., Taub R., Ellard S., Hattersley A.T., Matschinsky F.M.** (2005). Insights into the structure and regulation of glucokinase from a novel mutation (V62M), which causes maturity-onset diabetes of the young. *J Biol. Chem.* 280(14):14105-13.
- Goldberg H.J., Scholey J., Fantus I.G.** (2000). Glucosamine activates the plasminogen activator inhibitor 1 gene promoter through Sp1 DNA binding sites in glomerular mesangial cells. *Diabetes* 49: 863-871.
- Gosmain Y., Lefai E., Ryser S., Roques M., Vidal H.** (2004). Sterol regulatory element-binding protein-1 mediates the effect of insulin on hexokinase II gene expression in human muscle cells. *Diabetes.* 53(2):321-329.
- Gosmain Y., Dif N., Berbe V., Loizon E., Rieusset J., Vidal H., Lefai E.** (2005). Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *J. Lipid Res.* 46 (4): 697-705.
- Gottlieb T.M., Jackson S.P.** (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell.* 72 (1): 131-42.
- Graham F.L., van der Eb A.J.** (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology.* 54 (2): 536-9.
- Granner D., Andreone T., Sasaki K., Beale E.** (1983). Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin. *Nature.* 305 (5934): 549-51.
- Granner D., Pilkis S.** (1990). The genes of hepatic glucose metabolism. *J Biol Chem.* 265(18):10173-6. Review.

Gregori C., Guillet-Deniau I., Girard J., Decaux J.F., 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(2):410-4.

Griffith L.S., Schmitz B. (1999). O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. *Eur. J. Biochem* 262: 824-831.

Grimsby J., Coffey J.W., Dvorozniak M.T., Magram J., Li G., Matschinsky F.M., Shiota C., Kaur S., Magnuson M.A., Grippo, J.F. (2000). Characterization of glucokinase regulatory protein-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 275: 7826-7831.

Grimsby J., Sarabu J., Wendy L.C., Haynes N-E, Bizarro F.T., Coffey J.W., Guertin K.R., Hilliard D.W., Kester R.F., Mahaney P.E., Marcus L., Qi L., Spence C.L., Teng J., Magnuson M.A., Chu C.A., Dvorozniak M.T., Matschinsky F.M., Grippo J.F. (2003). Allosteric Activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. 301: 370-373.

Grimsby J., Matschinsky F.M, Grippo J.F. (2004). Discovery and actions on glucokinase activators. *In glucokinase and glycemic disease: from basics to novel therapeutics. Front Diabetes.* Vol 16. Matchinsky F.M., Magnuson M.A, Eds. Basel, Karger. 360-378.

Grupe A., Hultgren B., Ryan A., Ma Y.H., Bauer M., Stewart T.A. (1995). Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell.* 6;83(1):69-78.

Gualberto A., Baldwin A.S. (1995). p53 and Sp1 interact and cooperate in the tumor necrosis factor-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *J Biol Chem.* 270(34):19680-3.

Guillet-Deniau I, Mieulet V., Le Lay S., Achouri Y., Carré D., Girard J., Fougelle F., Ferré P. (2002). Sterol regulatory element binding protein-1c expression and action in rat muscles: insulin-like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression. *Diabetes.* 51(6):1722-8.

Guillet-Deniau I, Pichard A.L., Kone A., Esnous C., Nieruchalski M., Girard J., Prip-Buus C. (2004). Glucose induces de novo lipogenesis in rat muscle satellite cells through a sterol-regulatory-element-binding-protein-1c-dependent pathway. *J. Cell. Sci.* 117 (Pt 10): 1937-44.

Guyot E., Diaz J.P., Romestand B., Connes R. (1998). Insulin during the early postembryonic development of the gilt-head sea bream, *Sparus aurata*: ultrastructural, immunohistochemical, and biochemical studies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110 (2): 147-56.

H

Hagen G., Müller S., Beato M., Suske G. (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res.* 20 (21): 5519-25.

Hagen G., Muller S., Beato M., Suske G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J.* 13: 3843-3851

Hagen G., Dennig J., Preiss A., Beato M., Suske G. (1995). Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J. Biol. Chem.* 270: 24989-24994.

Haidweger E., Novy M., Rotheneder H. (2001). Modulation of Sp1 activity by a cyclin A/CDK complex. *J. Mol. Biol.* 306: 201-212.

Hall J.R., MacCormack T.J., Barry C.A., Driedzic W.R. (2004). Sequence and expression of a constitutive, facilitated glucose transporter (GLUT1) in Atlantic cod *Gadus morhu*. *J.of Exp. Biol.* 207: 4697-4706.

- Hall J.R., Richards R.C., MacCormack T.J., Ewart K.V., Driedzic W.R.** (2005). Cloning of GLUT3 cDNA from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and expression of GLUT1 and GLUT3 in response to hypoxia. *Biochim Biophys Acta*. 1730: 245-252.
- Hall R.K., Wang X.L., George L., Koch S.R., Granner D.K.** (2007). Insulin represses phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by causing the rapid disruption of an active transcription complex: a potential epigenetic effect. *Mol. Endocrinol.* 21 (2): 550-63.
- Hamm-Künzelmann B., Schäfer D., Weigert C., Brand K.** (1997). Glucose regulates the promoter activity of aldolase A and pyruvate kinase M2 via dephosphorylation of Sp1. *FEBS Lett.* 403: 87-90.
- Han I., Kudlow J.E.** (1997). Reduced O-glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol. Cell. Biol.* 17: 2550-2558.
- Hansmannel F., Mordier S., 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(2): 275-83.
- Hardon E.M., Frian M., Paonessa G., Cortese R.** (1988) Two distinct factors interact with the promoter regions of several liver-specific genes. *EMBO J.* 7: 1711-1719.
- Hariharan N., Farrelly D., Hagan D., Hillyer D., Arbeeny C., Sabrah K., Treloar A., Brown K., Kalinowski S., Mookhtiar K.** (1997). Expression of human hepatic glucokinase in transgenic mice liver results in decreased glucose levels and reduced body weight. *Diabetes.* 46: 11-16.
- Harrison S.M., Houzelstein D., Dunwoodie S.L., Beddington R.S.,** (2000). Sp5, a new member of the Sp1 family, is dynamically expressed during development and genetically interacts with Brachyury. *Dev. Biol.* 227: 358-372.
- Hasty A., Shimano H., Yahagi N., Amemiya-Kudo M., Perrey S., Yoshikawa T., Osuga J, Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Shionoiri F., Ohashi K., Harada K, Gotoda T., Nagai R., Ishibashi S., Yamada N.** (2000). Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 is regulated by glucose at the transcriptional level. *Jour. Biol. Chem.* 275:31069-31077.
- Hattersley A.T., Turner R.C., Permutt M.A., Patel P., Tanizawa Y., Chiu K.C., O'Rahilly S., Watkins P.J., Wainscoat J.S.** (1992). Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet.* 339 (8805): 1307-10.
- Hayzer D.J., Iynedjian P.B.** (1990). Alternative splicing of glucokinase mRNA in rat liver. *Biochem. J.* 270: 261-263.
- Hegarty B.D., Bobard A., Hainault I., Ferre P., Bossard P., 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 USA.* 102: 791-796.
- Heinemeyer T., Chen X., Karas H., Kel A.E., Kel O.V., Liebich I., Meinhardt T., Reuter I., Schacherer F., Wingender E.** (1999). Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 27:319-322.
- Heine-Suñer, D., Díaz-Guillén, M. A., Lange, A. J., Rodríguez de Córdoba, S.** (1998) Sequence and structure of the human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase heart isoform gene (PFKFB2). *Eur. J. Biochem.* 254: 103-110.
- Hemre G. I., Lie O., Lambertsem G., Sundby A.** (1990) *Dietary carbohydrate utilization in cod (Gadus morhua)*. Hormonal response of insulin, glucagon and glucagon-like peptide to diet and starvation. *Comp. Biochem. Physiol.* 97A, 41-44.
- Heredia V., Thomson J., Nettleton D., Shaoxian S.** (2005). Glucose-induced conformational changes in glucokinase mediate allosteric regulation: transient kinetic analysis. *Biochemistry.* 45: 7553-7562.

- Heredia V.V., Carlson T.J., Garcia E., Sun S.** (2006). Biochemical basis of glucokinase activation and the regulation by glucokinase regulatory protein in naturally occurring mutations. *J Biol Chem.* 2006 281(52):40201-7.
- Hermfisse U., Schäfer D., Netzler R., Brand K.** (1996). The aldolase A promoter in proliferating rat thymocytes is regulated by a cluster of Sp1 sites and a distal modulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225: 997-1005.
- Hers H.G., Van Schaftingen E.** (1982). Fructose 2,6-biphosphate 2 years after its discovery. *Biochem J.* 206:1-12.
- Hoey T., Weinzierl R.O.J., Gill G., Chen J.L., Dynlacht B.D., Tjian R.** (1993). Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell.* 72: 247-260.
- Hopper, S., Segal, H.L.** (1964). Comparative properties of glutamic-alanine transaminase from several sources. *Arch. Biochem. Biophys.* 105: 501-505.
- Hoppner, W., Seitz, H.J.** (1989) Effect of thyroid hormones on glucokinase gene transcription in rat liver. *J. Biol. Chem.* 264:20643-20647.
- Horton J.D., Bashmakov Y., Shimomura I., Shimano H.** (1998). Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refeed mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(11):5987-92.
- Horton J.D.** (2002). Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 30(Pt 6): 1091-5. Review.
- Hua X., Sakai J., Ho Y.K., Goldstein J.L., Brown M.S.** (1995). Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J. Biol. Chem.* 270 (49): 29422-7.
- Hue, L., Rider, M.H.** (1987). Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Review article. Biochem. J.* 245: 313-324.
- Hung J.J., Wang, Y.T., Chang W.C.,** (2006). Sp1 Deacetylation induced by Phorbol Ester Recruits p300 to activate 12(S)-Lipoxygenase Gene Transcription. *Mol. Cell Biol.* 26: 1770-1785

I

- Ihn H., Trojanowska M.** (1997). Sp3 is a transcriptional activator of the human alpha2(I) collagen gene. *Nucleic Acids Res.* 25 (18): 3712-7.
- Imataka H., Sogawa K., Yasumoto K., Kikuchi Y., Sasano K., Kobayashi A., Hayami M., Fujii-Kuriyama Y.** (1992). Two regulatory proteins that bind to the basic transcription element (BTE), a GC box sequence in the promoter region of the rat P-4501A1 gene. *EMBO J.* 11(10):3663-71.
- Iynedjian, P. B., Ucla, C., Mach, B.** (1987) Molecular cloning of glucokinase cDNA. *J. Biol. Chem.* 262: 6032-6038.
- Iynedjian, P.B., Gjinovci, A., Renold, A.E.** (1988). Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats. *J. Biol. Chem.* 263: 740-744.
- Iynedjian, P.B., Jotterand, D., Asfari, M., 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.
- Iynedjian, P.B.** (1993). Mammalian glucokinase and its gene. Review article. *Biochem. J.* 293: 1-13.

Iynedjian P.B., Marie S., Gjinovci A., Genin B., Deng S.P., Buhler L., Morel P., Mentha G. (1995). Glucokinase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the human liver. Regulation of gene expression in cultured hepatocytes. *J Clin Invest.* 95(5):1966-73.

Iynedjian, P.B., Marie, S., Wang, H., Gjinovci, A., Nazaryan, K. (1996). Liver-specific enhancer of the glucokinase gene. *J. Biol. Chem.* 271: 29120-29120.

Iynedjian, P.B. (1998). Identification of upstream stimulatory factor as transcriptional activator of the liver promoter of the glucokinase gene. *Biochem. J.* 333: 705-712.

Iynedjian P.B., Roth R.A., Fleischmann M., Gjinovci A. (2000). Activation of protein kinase B/cAect I hepatocytes is sufficient for the induction of expression of the gene encoding glucokinase. *Biochem J.* 351: 621-627.

Iynedjian P.B. (2004). Molecular biology of glucokinase regulation. In glucokinase and glycemic disease: from basics to novel therapeutics. *Front Diabetes. Vol 16. Matchinsky F.M., Magnuson M.A, Eds. Basel, Karger.* 155-168.

J

Jackson S.P., Tjian R. (1988) O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanism of transcriptional regulation. *Cell.* 55:125-133.

Jackson S.P., MacDonald J.J., Lees-Miller S., Tjian R. (1990). GC box-binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell.* 63: 155-165.

Jetton, T.L., Liang, Y., Pettepher, C.C., Zimmerman, E.C., Cox, F.G., Horvath, K., Matschinky, F.M., Magnuson, M.A. (1994). Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in brain and gut. *J. Biol. Chem.* 269: 3641-3654.

Joaquin M., Salvado C., Bellosillo B., Lange A. J., Gil, J., Tauler A. (1997) Effect of growth factors on the expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272: 2846-2851.

K

Kaczynski J., Cook T., Urrutia R. (2003). Sp1- and Krüpel-like transcription factors. *Genome Biol.* 4: 206.

Kadonaga J.T., Carner K.R., Masiarz F.R., Tjian R. (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA-binding domain. *Cell.* 51: 1079-1090.

Kadonaga J.T., Courey A.J., Ladika J., Tjian R., (1988). Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science.* 242: 1566-1570.

Kamata K., Mitsuya M., Nishimura T., Eiki J., Nagata Y. (2004). Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure.* 12: 429-438.

Kamemura K., Hart W.G. (2003). Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 73: 107-136.

Kang H.T., Ju J.W., Cho J.W., Hwang E.S. (2003). Down-regulation of Sp1 activity through modulation of O-glycosylation by treatment with a low glucose mimetic, 2-deoxyglucose. *J Biol Chem.* 278 (51): 51223-31.

Karlseder J., Rotheneder H., Wintersberger E. (1996). Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1659-1667.

- Kaushik S.J., Oliva-Teles A.** (1995). Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquaculture*. 50: 89-101.
- Keembiyehetty C.N., Candelaria R.P., Majumdar G., Raghov R., Martinez-Hernandez A., Solomon S.S.** (2002). Paradoxical regulation of Sp1 transcription factor by glucagon. *Endocrinology*. 143 (4): 1512-1520.
- Kennett S.B., Udvadia A.J., Horowitz J.M.,** 1997. Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic acids Res.* 25: 3110-3117.
- Kesavan P., Wang L., Davis E., Cuesta A., Sweet I., Niswender K., Magnuson M.A., Matschinsky F.M.** (1997). Structural instability of mutant beta-cell glucokinase: implications for the molecular pathogenesis of maturity-onset diabetes of the young (type-2). *Biochem J.* 322 (1):57-63.
- Kietzmann T., Roth U., Freimann S., 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. *J. Biol. Chem.* 321: 17-20.
- Kim J.D., Kaushik S.J.** (1992). Contribution of digestible energy from carbohydrates and estimation of protein/energy requirements for growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 106: 161-169.
- Kim J.B., Spotts G.D., Halvorsen Y.D., Shih H.M., Ellenberger T., Towle H.C., Spiegelman B.M.** (1995). Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol. Cell Biol.* 15 (5): 2582-8.
- Kim J.B., Sarraf P., Wright M., Yao K.M., Mueller E., Solanes G., Lowell B.B., Spiegelman B.M.** (1998). Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J. Clin. Invest.* 101 (1): 1-9.
- Kim S.Y., Kim H.I., Kim T.H., Im S.S., Park S.K., Lee I.K., Kim K.S., Ahn Y.H.** (2004a). SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression. *J. Biol. Chem.* 279: 30823-30829.
- Kim S.Y., Kim H.I., Park S.K., Im S.S., Li T., Cheon H.G., Ahn Y.H.** (2004b). Liver glucokinase can be activated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*. 53:66-70.
- Kingsley C., Winoto A.** (1992). Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol. Cell Biol.* 12: 4251-4261
- Kirchner S., Kaushik S., Panserar S.** (2003). Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol.* 134: 337-347.
- Kirchner S., Seixas P. Kaushik S., Panserat S.** (2005). Effects of low protein intake on extra-hepatic gluconeogenic enzyme expression and peripheral glucose phosphorylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 140(2):333-40.
- Kitamura K., Uyeda K.** (1988). Purification and characterization of myocardial fructose-6-phosphate,2-kinase and fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 263: 9027-9033.
- Koranyi L. I., Tanizawa Y., Welling C. M., Rabin D. U., Permutt M. A.** (1992) Human islet glucokinase gene: isolation and sequence analysis of full-length cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 41: 807-811.
- Kotzka J., Muller-Wieland D., Koponen A., Njamen D., Kremer L., Roth G., Munck M., Knebel B., Krrone W.** (1998). ADD1/SREBP-1c mediates insulin-induced expression linked to the MAP kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 375-379.

- Kozak M.** (1987). An analysis of 5' noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acid Res.* 15: 8125-8148.
- Kozak M.** (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870.
- Kozak M.** (1996) Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mammalian genome.* 7:563-574.
- Kozak M.** (1997) Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J.* 16(9): 2482-2492.
- Krasnov A., Teerijoki H., Molsa H.** (2001). Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochim Biophys Acta.* 1520(2):174-178.
- Kreegipuu A., Blom N., Brunak S.** (1999). PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0. *Nucleic Acids Res.* 27(1): 237-9.
- Kurland I.J., Pilkis S.J.** (1995). Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: insights into autoregulation of a bifunctional enzyme. *Protein Sci.* 4(6): 1023-37.
- Kuwajima M., Golden S., Katz J., Unger R.H., Foster D.W., McGarry J.D.** (1986). Active hepatic glycogen synthesis from gluconeogenic precursors despite high tissue levels of fructose 2,6-bisphosphate. *J Biol Chem.* 25; 261:2632-7.

L

- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lange A.J., El-Maghrabi M.R., Pilkis S.J.** (1991) Isolation of bovine liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase cDNA: bovine liver and heart forms of the enzyme are separate gene products. *Arch. Biochem. Biophys.* 290: 258-263.
- Lannoy V.J., Decaux J.F., Pierreux C.E., Lemaigre F.P., Rousseau G.G.** (2002). Liver glucokinase gene expression is controlled by the onecut transcription factor hepatocyte nuclear factor-6. *Diabetologia.* 45(8):1136-41.
- Larsson A., Lewander K.** (1973). Metabolic effects of starvation in the eel (*Anguilla anguilla* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 44A: 367-374.
- Laybutt D.R., Sharma A., Sgroi D.C., Gaudet J., Bonner-Weir S., Weir G.C.** (2002). Genetic regulation of metabolic pathways in beta-cells disrupted by hyperglycemia. *J Biol Chem.* 277(13):10912-21.
- Legate N.J., Bonen A., Moon T.W.** (2001). Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla rostrata*), and black bullhead catfish (*Ameiurus melas*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 122 (1): 48-59.
- Legget R.W., Armstrong S.A., Barry D., Christopher R.M.** (1995). Sp1 is phosphorylated and its DNA binding activity down-regulates upon terminal differentiation of the liver. *J. Biol. Chem.* 270: 25879-25884.
- Lemaigre F.P., Durviaux S.M., Rousseau G.G.** (1991). Identification of regulatory sequences and protein-binding sites in the liver-type promoter of a gene encoding 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Mol. and Cell. Biol.* 11(2): 1099-1106.
- Lemaigre F.P., Durviaux S.M., Rousseau G.G.** (1993). Liver-specific factor binding to the liver promoter of a 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *J. Biol. Chem.* 268: 19896-19905.

Lemaigre F.P., Rousseau G.G.(1994). Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem J.* 303: 1-14.

Li L., Lange A.J., Pilkis S.J. (1993). Isolation of a cDNA for chicken liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 397-405.

Li B., Adams C.C., Workman J.L., (1994). Nucleosome binding by the constitutive transcription factor Sp1. *J. Biol. Chem.* 169: 7756-7763.

Liang G., Yang J., Horton J.D., Hammer R.E., Goldstein J.L., 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 (11): 9520-8.

Liang Y., Jetton T., Zimmerman E.C., Najafi H., Matschinsky F.M., Magnuson M.A. (1991). Effects of alternate RNA splicing on glucokinase isoform activities in the pancreatic islet, liver and pituitary. *J. Biol. Chem.* 266: 6999-7007.

Liang Y., Kesavan P., Wang L.Q., Niswender K., Tanizawa Y., Permutt M.A., Magnuson M.A., Matschinsky F.M. (1995). Variable effects of maturity-onset-diabetes-of-youth (MODY)-associated glucokinase mutations on substrate interactions and stability of the enzyme. *Biochem. J.* 309: 167-173.

Lin S.Y., Black A.R., Kostic D., Pajovic S., Hoover C.N., Azizkhan J.C. (1996). Cell cycle regulated association of E2F and Sp1 is related to their functional interaction. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1668-1675.

Lively M.O., El-Maghrabi M.R., Pilkis J., D'Angelo G., Colosia A.D., Ciavola, J-A., Fraser B. A., Pilkis S.J. (1988). Complete amino acid sequence of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 263: 839-849.

Lou Z., Maher V.M., McCormick J.J. (2005). Identification of the promoter of human transcription factor Sp3 and evidence of the role of factors Sp1 and Sp3 in the expression of Sp3 protein. *Gene.* 351: 51-59.

Lupiáñez J.A., Sánchez-Lozano M.J., García-Rejón L., de la Higuera M. (1989) Long-term effect of a high protein/non carbohydrate diet on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture.* 79, 91-101.

M

Macleod D., Charlton J., Mullins J., Bird A.P. (1994). Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev.* 8: 2282-2292.

Magnuson M.A., Andreone T.L., Printz R.L., Granner D.K. (1989a). Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 4838-4842.

Magnuson, M.A., Shelton, K.D. (1989b). An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell. *J. Biol. Chem.* 264: 15936-15942.

Magnuson, M. A. (1990) Glucokinase gene structure: functional implications of molecular genetic studies. *Diabetes* 39: 523-527.

Magnuson M.A. (1992). Tissue-specific regulation of glucokinase gene expression. *J. Cell Biochem.* 48(2):115-21.

Magnuson M.A., Matschinsky F.M. (2004). Glucokinase as a glucose sensor: past, present and future. *In glucokinase and glycemic disease: from basics to novel therapeutics.* *Front Diabetes.* Vol 16. Matchinsky F.M., Magnuson M.A, Eds. Basel, Karger, 2004, p. 1-17.

Majello B., De Luca P., Suske G., Lania L. (1995). Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins. *Oncogene.* 10: 1841-1848.

- Majumdar G., Harmon A., Cndelaria R., Martinez-Hernandez A., Raghov R., Solomon S.S.** (2003). O-glycosilation of Sp1 and transcriptional regulation of the calmodulin gene by insulin and glucagon. *Am. J. Physiol.* 285: E584-E591.
- Majumdar G., Harrington A., Hungerford JU., Martinez-hernandez A., Gerling I.C., Raghov R., Solomon S.S.** (2006). Insulin dynamically regulates calmodulin gene expression by sequential O-glycosylation and phosphorylation of Sp1 and its subcellular compartmentalization in liver cells. *J. Biol. Chem.* 281: 3642-3650.
- Majumdar G., Wright J., Markowitz P., Martinez-Hernandez A., Raghov R., Solomon S.S.** (2004). Insulin stimulates and diabetes inhibits O-linked N-acetylglucosamine transferase and O-glycosilation of Sp1. *Diabetes* 53:3184-3192.
- Marin M., Karism A., Visser P., Grosveld F., Philipson S.** (1997) Transcription factor Sp1 is essential for early embrionic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell.* 89:619-628.
- Manzano A., Pérez J. X., Nadal M., Estivill X., Lange A., Bartrons R.** (1999). Cloning, expression and chromosomal localization of a human testis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Gene.* 229: 83-89.
- Massa L., Baltrusch S., Okar D.A., Lange A.J., Lenzen S., Tiedge M.** (2004). Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells. *Diabetes.* 53: 1020-1029.
- Mastrangelo D., Acquaviva A., Di Pisa F., Hadjistilianou T., Frezzotti R.** (1991). Italian register for retinoblastoma. Pros and cons of a retrospective statistical study. *Ophthalmic Paediatr Genet.* 12(2): 73-8.
- Matschinsky F.M., Ellerman J.E.** (1968). Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.* 243(10):2 730-6.
- Matschinsky F.M.** (1990). Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes.* 39(6): 647-52. Review.
- Matschinsky F.M.** (1996) A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes.* 45: 223-241.
- Matschinsky F.M.** (2002). Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes.* 51 (3): S394-404. Review.
- Matschinsky F.M.** (2005). Glucokinase, glucose homeostasis, and diabetes mellitus. *Curr. Diabetes Rep.* 5: 171-176.
- Matschinsky F.M., Magnuson M.A., Zelent D., Jetton T.L., Doliba N., Han Y., Taub R., Grimsby J.** (2006). The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes.* 55: 1-12
- Matsuda M., Korn B.S., Hammer R.E., Moon Y.A., Komuro R., Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S., Shimomura I.** (2001). SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes Dev.* 15 (10): 1206-16.
- Matsuzaka T., Shimano H., Yahagi N., amemiya-Kudo M., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Ohashi K., Tomita S., Sekiya M., Hasty A., Nakagawa Y., Sone H., Toyoshima H., Ishibashi S., Osuga J., Yamada N.** (2004). Insulin-independent induction of sterol regulatory element binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin treated mice. *Diabetes.* 53: 560-569.

- McFarlan S.C., Zhang Q., Miksicek R.J., Lange A.J.** (1997). Characterization of an intronic hormone response element of the rat liver/skeletal muscle 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Mol. and Cell. Endocrin.* 129: 219-227.
- McPherson M.J., Quirke P., Taylor G.R.** (1991). PCR practical approach. *Oxford University Press*. New York.
- McVie-Wylie A.J., Lamson D.R., Chen Y.T.** (2001). Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics.* 72 (1): 113-7.
- Meglason M.D., Matschinsky F.M.** (1984). New perspectives on pancreatic islet glucokinase. *Am J Physiol.* 246(1 Pt 1):E1-13. Review.
- Meglason M.D., Matschinsky F.M.** (1986). Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev.* 2(3-4):163-214.
- Merchant J.L., Shiotani A., Mortensen E.R., Shumaker D.K., Abraczinskas D.R.** (1995). Epidermal growth factor stimulation of the human gastrin promoter requires Sp1. *J Biol Chem.* 270(11): 6314-9.
- Merchant J.L., Du M., Todisco A.** (1999). Sp1 phosphorylation by Erk 2 stimulates DNA binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 254: 454-461.
- Merika M., Orkin S.H.** (1995). Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2437-2447.
- Metón I., Caseras A., Mediavilla D., Fernández F., Baanante I.V.** (1999a). Molecular cloning of a cDNA encoding 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from liver of *Sparus aurata*: nutritional regulation of enzyme expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1444: 153-165.
- Metón, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Cantó, E., Fernández, F., Baanante, I. V.** (1999b). Effects of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-glyconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br. J. Nutr.* 83(3): 223-232.
- Metón, I., Caseras, A., Fernández, F., Baanante, I. V.** (2000). 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase is regulated by diet composition and ration size. *Biochim. Biophys. Acta.* 1491: 220-228.
- Metón I., Egea M., i Baanante I.V.** (2003). New insights into the regulation of hepatic metabolism in fish. A: *Recent Research Advances in Biochemistry.* 4: 125-149.
- Metón I., Caseras A., Fernandez F., Baanante I.V.** (2004). Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 138 (2): 145-153.
- Metón I., Egea M., Anemaet I.G., Fernandez F., Baanante I.V.** (2006). Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. *Endocrinology.* 147 (7): 3446-56.
- Miller S.P., Anand G.R., Karschnia E.J., Bell G.I., LaPorte D.C., Lange A.J.** (1999). Characterization of glucokinase mutations associated with maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2). *Diabetes.* 48: 1645-1651.
- Miserez A.R., Cao G., Probst L.C., Hobbs H.H.** (1997). Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2). *Genomics.* 40 (1): 31-40.
- Moates J.M., Shelton K.D., Magnuson M.A.** (1996). Characterization of the Pal motifs in the upstream glucokinase promoter: binding of a cell type-specific protein complex correlates with transcriptional activation. *Mol Endocrinol.* 10(6):723-31.

- Moates J.M., Nanda S., Cissell M.A., Tsai M.J., Stein R.** (2003). BETA2 activates transcription from the upstream glucokinase gene promoter in islet beta-cells and gut endocrine cells. *Diabetes*. 52(2):403-8.
- Moates J.M., Magnuson M.A.** (2004). The Pal elements in the upstream glucokinase promoter exhibit dyad symmetry and display cell-specific enhancer activity when multimerised. *Diabetologia*. 47(9):1632-40.
- Mommsen T.P., Plisetskaya E.M.** (1991). Insulin in fishes and agnathans: history, structure and metabolic regulation. *Rev Aquat Sci*. 4: 225-259.
- Moon T.W., Foster G.D.** (1995). Biochemistry and molecular biology of fishes. P.W. Hochachka and T.P.
- Moon T.W.** (2001). Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129(2-3): 243-9.
- Morata P., Vargas A. M., Sánchez-Medina F., García M., Gardenete G., Zamora S.** (1982) Evolution of gluconeogenic enzyme activities during starvation in liver and kidney of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 71B: 65-70.
- Moorefield K.S., Fry S.J., Horowitz J.M.** (2004). Sp2 DNA binding activity and trans-activation are negatively regulated in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 279(14):13911-24.
- Moorefield K.S., Yin H., Nichols T.D., Cathcart C., Simmons S.O., Horowitz J.M.** (2006). Sp2 localizes to subnuclear foci associated with the nuclear matrix. *Mol. Biol. Cell.* 17 (4): 1711-22.
- Moreno-Aliaga M.J., Swarbrick M., Lorente-Cebrián S., Stanhope K.L., Havel P.J., Martínez J.A.** (2007). Sp1-Mediated transcription is involved in the induction of leptin by insulin-stimulated glucose metabolism. *J. Mol. Endocrinol.* 38(5): 537-46.
- Mortensen E.R., Marks P.A., Shiotani A., Merchant J.L.** (1997). Epidermal growth factor and okadaic acid stimulate Sp1 proteolysis. *J Biol Chem.* 272(26):16540-7.
- Moukil M., Veiga-da-Cunha M., Van Schaftingen E.** (2000). Study of the regulatory properties of glucokinase by site-directed mutagenesis. *Diabetes*. 499: 195-201.
- Moukil M.A., Van Schaftingen E.** (2001). Analysis of the cooperativity of human beta-cell glucokinase through the stimulatory effect of glucose on fructose phosphorylation. *J Biol Chem.* 276(6):3872-8.
- Mounier C., Posner B.I.** (2006). Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84 (7): 713-24. Review.
- Mukhtar M., Stubbs M., Agius L.** (1999). Evidence for glucose and sorbitol-induced nuclear export of glucokinase regulatory protein in hepatocytes. *FEBS Letters*. 462: 453-458.
- Muñoz-Alonso M.J., Guillemain G., Kassis N., Girard J., Burnol A.F. i Leturque A.** (2000). A novel cytosolic dual specificity phosphatase, interacting with glucokinase, increases glucose phosphorylation rate. *J. Biol. Chem.* 275: 32406-32412.
- Murao K., Wada Y., Nakamura T., Taylor A.H., Mooradian A.D., Wong N.C.W.** (1998). Effects of glucose and insulin on rat apolipoprotein A-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 273: 18959-18965.
- Murata Y., Kim H.G., Rogers K.T., Udvardia A.J., Horowitz J.M.,** 1994. Negative regulation of Sp1 trans-activation is correlated with the binding of cellular proteins to the amino terminus of the Sp1 transactivation domain. *J. Biol. Chem.* 269, 20674-20681.

N

- Nagai M., Ikeda S.** (1971). Carbohydrate metabolism in fish. Effects of starvation and dietary composition on the blood glucose level and the hepatopancreatic glycogen and lipid contents in carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 37: 404-409.
- Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., de Crombrughe B.,** (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 108: 17-29
- Narkewicz M.R., Iynedjian P.B., Ferre P., Girard J.** (1990). Insulin and tri-iodothyronine induce glucokinase mRNA in primary cultures of neonatal rat hepatocytes. *Biochem. J.* 271: 585-589.
- Neet K.E.** (1980). Cooperativity in enzyme function: equilibrium and kinetic aspects. *Methods Enzymol.* 64:139-92.
- Netzker R., Weigert C., Brand K.** (1997). Role of the stimulatory proteins Sp1 and Sp3 in the regulation of transcription of the rat pyruvate kinase M gene. *Eur. J. Biochem.* 245: 174-181.
- Nicolás M., Noé V., Jensen K.B., Ciudad C.J.** (2001). Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human transcription factor Sp1 gene. *J. Biol. Chem.* 276: 22126-22132.
- Nicolás M., Noe V., Ciudad C.J.** (2003). Transcriptional regulation of the human Sp1 gene promoter by the specificity protein (Sp) family members nuclear factor Y (NF-Y) and E2F. *Biochem. J.* 371: 265-275.
- Niemeyer H., Perez N., Codoceo R.** (1967). Liver glucokinase induction in acute and chronic insulin insufficiency in rats. *J. Biol. Chem.* 242: 860-864.
- Niemeyer H., Ureta T., Clark-Turri L.** (1975). Adaptive character of liver glucokinase. *Mol Cell Biochem.* 6(2):109-26. Review.
- Nigg E. A.** (1997) Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature.* 386:779-787.
- Niswender K.D., Postic C., Jetton T.L., Bennett B.D., Piston D.W., Efrat S., Magnuson M.A.** (1997a) Cell-specific expression and regulation of a glucokinase gene locus transgene. *J. Biol. Chem.* 272: 22564-22569.
- Niswender K.D., Shiota M., Postic C., Cherrington A.D., Magnuson M.A.** (1997b) Effects of increased glucokinase copy number on glucose homeostasis and hepatic glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 272: 22570-22575.
- Njolstad P.R., Sovik O., Cuesta-Munoz A., Bjorkhaug L., Massa O., Barbetti F., Undlien D.E., Shiota C., Magnuson M.A., Molven A., Matschinsky F.M., Bell G.I.** (2001). Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 344(21):1588-92.
- Noé V., Alemany C., Chasin L.A., Ciudad C.J.** (1998). Retinoblastoma protein associates with Sp1 and activates the hamster dihydrofolate reductase promoter. *Oncogene.* 16(15): 1931-8.
- Nordlie R.C., Foster J.D., Lange A.J.** (1999) Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.* 19: 379-406.

O

- Oates A.C., Pratt S.J., Vail B., Yan Y.I., Ho R.K., Johnson S.L., Postlethwait J.H., Zon LI.** (2001). The zebrafish klf gene family. *Blood.* 98: 1792-1801.

O'Doherty R.M., Lehman D.L., Seoane J., Gómez-Foix A.M., Guinovart J.J., Newgard C.B. (1996) Differential metabolic effects of adenovirus-mediated glucokinase and hexokinase I overexpression in rat primary hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 271: 20524-20530.

Okar D.A., Lange A.J. (1999). Fructose-2,6-biphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors.* 10:1-14.

Okar D.A., Manzano A., Navarro-Sabate A., Riera L., Bartrons R., Lange A.J. (2001). PFK-2/FBPase-2: marker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-biphosphate. *Trends Biochem. Sci.* 26: 30-35.

Okar D.A., Wu C., Lange A.J. (2004). Regulation of the regulatory enzyme, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Adv. Enzyme Regul.* 44:123-54.

Oliner J.D., Andresen J.M., Hansen S.K., Zhou S., Tjian R. (1996). SREBP transcriptional activity is mediated through an interaction with the CREB-binding protein. *Genes Dev.* 10(22):2903-11.

Onuma H., Vander Kooi B.T., Boustead J.N., Oeser J.K., O'Brien R.M. (2006). Correlation between FOXO1a (FKHR) and FOXO3a (FKHRL1) binding and the inhibition of basal glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription by insulin. *Mol. Endocrinol.* 20 (11): 2831-47.

Ossipova O., Stick R., Pieler T. (2002). XSPR-1 and XSPR-2, novel Sp1 related zinc finger containing genes, are dynamically expressed during *Xenopus* embryogenesis. *Mech. Dev.* 115: 117-122.

P

Pai J.T., Guryev O., Brown M.S., Goldstein J.L. (1998). Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 273 (40): 26138-48.

Palmer T. N., Ryman B. E. (1972). Studies on oral glucose tolerance tests in fish. *J. Fish Biol.* 4: 311-319.

Pan X., Solomon S.S., Shah R.J., Palazzolo M.R., Raghov R.S. (2000). Members of the Sp transcription factor family regulate rat calmodulin gene expression. *J. Lab. Clin. Med.* 136 (2): 157-63.

Pan X., Solomon S.S., Borromeo D.M., Martinez-Hernandez A., Raghov R. (2001). Insulin deprivation leads to deficiency of Sp1 transcription factor in H-411E Hepatoma cells and in Streptozotocin-Induced Diabetic Ketoacidosis in the rat. *Endocrinology.* 142: 1635-1642.

Pang R.T-K., Lee L.T-O, Sai-Ming NG. S., Yung W-H, Chow B.K-C. (2004). CpG methylation and transcription factors Sp1 and Sp3 regulate the expression of the human secretin receptor gene. *Mol. Endocrinol.* 18 (2): 471-483.

Panserat S., Blin C., Médale F., Plagnes-Juan E., Brèque J., Krishnamoorthy J., Kaushik S. (2000a) Molecular cloning, tissue distribution and sequence analysis of complete glucokinase cDNAs from gilthead seabream (*Sparus aurata*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochem. Biophys. Acta.* 1474: 61-69.

Panserat S., Médale F., Brèque J., Plagnes-Juan E., Kaushik S. (2000b) Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr. Biochem.* 11: 22-29.

Panserat S., Médale F., Blin C., Brèque J., Vachot C., Plagnes-Juan E., Gomes E., Krishnamoorthy R., Kaushik S. (2000c). Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 278: R1164-R1170.

- Panserat S., Capilla E., Gutierrez J., Frappart P.O., Vachot C., Plagnes-Juan E., Aguirre P., Brèque J., Kaushik S.** (2001). Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comp. Bioch. Physiol.* 128: 275-283.
- Panserat S., Perrin A., Kaushik S.** (2002). High dietary lipids induce liver glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. nutr.* 132:137-141.
- Parakati R., DiMario J.X.** (2002). Sp1- and Sp3-mediated transcriptional regulation of the fibroblast growth factor receptor 1 gene in chicken skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 277(11):9278-85.
- Párrizas, M., Baños N, Baró J, Planas, J., Gutiérrez, J.** (1994a). Up-regulation of insulin binding in fish skeletal muscle by high insulin levels. *Regul Pept* 53: 211-222.
- Párrizas, M., Planas, J., Plisetskaya, E. M., Gutiérrez, J.** (1994b) Insulin receptor and its tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *Am. J. Physiol.* 266: 1944-1950.
- Parry M.J., Walker D.G.** (1966) Purification and properties of adenosine 5'-triphosphate-D-glucose 6-phosphotransferase from rat liver. *Biochem J.* 99: 266-274.
- Pascal E., Tjian R.** (1991). Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev.* 5(9):1646-56.
- Payne V.A., Arden C., Wu C., Lange A.J., Agius L.** (2005). Dual role of phosphofructokinase-2/fructose biphosphatase-2 in regulating the compartmentation and expression of glucokinase in hepatocytes. *Diabetes.* 54: 1949-1957.
- Pazin M.J., Sheridan P.L., Cannon K., Cao Z., Keck J.G., Kadonaga J.T., Jones K.A.** (1996). NF-kappa B-mediated chromatin reconfiguration and transcriptional activation of the HIV-1 enhancer in vitro. *Genes Dev.* 10(1): 37-49.
- Pearson T.H., Black K.D.** (2001). The environmental impact of marine cage culture. In: *Black, K.D. (Ed.), Environmental impacts of aquaculture.* Sheffield, 1-31.
- Pedelini L., Garcia-Gimeno M.A., Marina A., Gomez-Zumaquero J.M., Rodriguez-Bada P., Lopez-Enriquez S., Soriguer F.C., Cuesta-Munoz A.L., Sanz P.** (2005). Structure-function analysis of the alpha5 and the alpha13 helices of human glucokinase: description of two novel activating mutations. *Protein Sci.* 14(8): 2080-6.
- Penicaud L., Leloup C., Lorsignol A., Alquier T., Guillod E.** (2002). Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 5: 539-43.
- Perez J.X., Manzano A., Tauler A., Bartrons R.** (1998). Effect of starvation on gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in genetically obese (fa/fa) Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 22: 667-672.
- Perkins N.D., Edwards N.L., Duckett C.S., Agranoff A.B., Schmid R.M., Nabel G.J.** (1993). A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.* 12(9): 3551-8.
- Petersen K.F., Shulman G.I.** (2006). Etiology of insulin resistance. *Am.J.Med.* 119: S10-16.
- Phan D., Cheng C.J., Galfione M., Vakar-Lopez F., Tunstead J., Thompson N.E., Burgess R.R., Najjar S.M., Yu-Lee L.Y., Lin S.H.** (2004). Identification of Sp2 as a transcriptional repressor of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in tumorigenesis. *Cancer Res.* 64 (9): 3072-8.
- Philipsen S., Suske G.,** (1999). A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 27: 2991-3000.

- Pieper A., Pfeffer E.** (1980) Studies on the comparative efficiency of utilisation of gross energy from carbohydrates, proteins and fats by rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*. 20:323-332
- Pilkis S.J., El-Maghrabi M.R., McGrane M., Pilkis J.** (1981a) The role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of fructose 1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 256: 11489-11495.
- Pilkis S.J., El-Maghrabi M.R., Pilkis J., Claus T.** (1981b). Inhibition of fructose-1.6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 256: 3619-3622.
- Pilkis S.J., El-Maghrabi M.R., Pilkis J., Claus T.H., Cumming D.A.** (1981c). Fructose-2,6-bisphosphate. A new activator of phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 256: 3171-3174.
- Pilkis S.J., El-Maghrabi M.R., Claus, T.H.** (1988). Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 755-783.
- Pilkis S.J., Claus T.H.** (1991). Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. *Annu Rev. Nutr.* 11: 465-515.
- Pilkis S.J., Granner D.K.** (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol.* 54:885-909. Review.
- Pilkis S.J., Claus T.H., Kurland, I.J., Lange, A.J.** (1995). 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 799-835.
- Pillay T.V.R.** (1992). Aquaculture and the environment. *Fishing news Books*. Oxford. 189.
- Piston D.W., Knobel S.M., Postic C., Shelton K.D., Magnuson M.A.** (1999). Adenovirus-mediated knockout of a conditional glucokinase gene in isolated pancreatic islets reveals an essential role for proximal metabolic coupling events in glucose-stimulated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 274: 1000-1004.
- Planas J.V., Capilla E., Gutierrez J.** (2000). Molecular identification of glucose transporter from fish muscle. *FEBS Lett.* 481: 266-270.
- Plisetskaya E.M., Duguay S.J., Duan C.** (1994). Insulin and insulin-like growth factor I in salmonids: comparison of structure, function, and expression. In: Davey K.G., editor. *Perspectives in comparative endocrinology*. Ottawa: National Research Council of Canada; 226-233.
- Plisetskaya E.M.** (1998). Some of my not so favorite things about insulin and insulin-like growth factors in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 121 (1): 3-11. Review
- Polakof S., Míguez J.M., Soengas J.L.** (2007). Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: dependence of feeding. *Comp Biochem Physiol.* 14: 363-374.
- Postic C., Niswender K.D., Decaux J-F., Parsa R., Shelton K.D., Gouhot B., Pettepher C., Granner D.K., Girard J., Magnuson M.A.** (1995) Cloning and characterization of the mouse glucokinase gene locus and identification of distal liver-specific DNAase I hypersensitive sites. *Genomics.* 29: 740-750.
- Postic C., Shiota M., Niswender K.D., Jetton T.L., Chen Y., Moates J.M., Shelton K.D., Lindner J., Cherrington A.D., Magnuson M.A.** (1999). Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic β cell-specific gene knock-outs using cre recombinase. *J. Biol. Chem.* 274:305-315.
- Postic C., Shiota M., Magnuson M A.** (2001). Cell-specific roles of glucoquinase in glucose homeostasis. *Recent. Prog. Horm. Res.* 56: 195-217.
- Printz R.L., Magnuson M.A., Granner D.K.** (1993). Mammalian glucokinase. *Annu. Rev. Nutr.* 13: 463-496.
- Pugh B.F., i Tjian R.** (1991). Transcription from TATA-less promoter requires a multi-subunit TFIID complex. *Genes Dev.* 5: 1965-1945.

Pyko M., Rider M.H., Wegener G. (1993) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from frog skeletal muscle: purification, kinetics and immunological properties. *J. Comp. Physiol.* 163B: 89-98.

Q

Quaade C., Hughes S.D., Coats W.S., Sestak A.L., Iyenedjian P.B., Newgard C.B. (1991) Analysis of the protein products encoded by variant glucokinase transcripts via expression in bacteria. *FEBS Lett.* 280: 47-52.

R

Rafty L.A., Khachigian L.M. (2001). Sp1 phosphorylation regulates inducible expression of platelet-derived growth factor B-chain gene via atypical protein kinase C-zeta. *Nucleic Acids Res.* 29(5):1027-33

Rausa F.M., Tan Y., Zhou H., Yoo K.W., Stolz D.B., Watkins S.C., Franks R.R., Unterman T.G., Costa R.H. (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(21):8264-82.

Rawson R.B., Zelenski N.G., Nijhawan D., Ye J., Sakai J., Hasan M.T., Chang T.Y., Brown M.S., Goldstein J.L. (1997). Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol. Cell.* 1(1):47-57.

Reitz F.B., Pagliaro L. (1997). Does regulatory protein play role in a glucokinase localization? *Horm. Metab. Res.* 29: 317-321.

Repa J.J., Liang G., Bashmakov Y., Lobaccaro J.M., Shimomura I., Shan B., Brown M.S., Goldstein J.L., Mangelsdorf D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 14: 2819-2830.

Ribaux P., Gjinovci A., Sadowski H.B., Iyenedjian P.B. (2002). Discrimination between signaling pathways in regulation of specific gene expression by insulin and growth hormone in hepatocytes. *Endocrinology.* 143(10):3766-72.

Ribaux P.G., Iyenedjian P.B. (2003). Analysis of the role of protein kinase (cAKT) in insulin-dependent induction of glucokinase and sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP) mRNA in hepatocytes. *Biochem. J.* 376: 697-705.

Ricard J., Buc J., Meunier J.C. (1977). Enzyme memory. 1. A transient kinetic study of wheat-germ hexokinase LI. *Eur J Biochem.* 80(2):581-92.

Riu E., Bosch F., Valera A. (1996) Prevention of diabetic alterations in transgenic mice overexpressing Myc in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2198-2202.

Rizzo M.A., Magnuson M.A., Drain P.F., Piston D.W. (2002). A functional link between glucokinase binding to insulin granules and conformational alterations in response to glucose and insulin. *J Biol Chem.* 277(37):34168-75.

Rizzo M.A., Piston D.W. (2003). Regulation of beta cell glucokinase by S-nitrosylation and association with nitric oxide synthase. *J Cell Biol.* 161(2):243-8.

Rodriguez-Melendez R., Zempleni J. (2003). Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem.* 14(12):680-90. Review.

Rohlf C., Ahmad S., Borellini F., Lei J., Glazer R.I. (1997). Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272: 21137-21141.

Romero-Navarro G., Cabrera-Valladares G., German M. S., Matschinsky F. M., Velazquez A., Wang J., Fernandez-Mejia C. (1999) Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology*. 140: 4595-4600.

Roos M., Su K., Baker J., Kudlow J. (1997). O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* 17: 6472-6480.

Ross S., Best J.L., Zon L.I., Gill F. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* 10: 831-842.

Rosa J.L., Ventura F., Tauler A., Bartrons R. (1993). Regulation of hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression by glucagon. *J. Biol. Chem.* 268: 22540-22545.

Rossetti L. Giaccari A., Barzilai N., Howard K., Sebel G., Hu M. (1993). Mechanism by which hyperglycemia inhibits hepatic glucose production in conscious rats. Implications for the pathophysiology of fasting hyperglycemia in diabetes. *J. Clin. Invest.* 92: 1126-1134.

Roth U., Jungermann K., Kietzmann T. (2002). Activation of glucokinase gene expression by hepatic nuclear factor 4alpha in primary hepatocytes. *Biochem J.* 365:223-8.

Rotheneder H., Geymayer S., Haidweger E. (1999). Transcription factors of the Sp1 family: interaction with E2F and regulation of the murine thymidine kinase promoter. *J. Mol. Biol.* 293(5): 1005-15.

Ryu H., Lee J., Zaman K., Kubilis J., Ferrante R.J., Ross B.D., Neve R., Ratan R.R. (2003). Sp1 and Sp3 are oxidative stress-inducible, antideath transcription factors in cortical neurons. *J Neurosci.* 23(9):3597-606.

S

Saffer J.D., Jackson S.P., Annarella M.B. (1991). Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol.* 11(4):2189-99.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 680-685.

Sakai A., Watanabe F., Furuya E. (1994) Cloning of cDNAs for fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from frog skeletal muscle and liver and their expression in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198: 1099-1106.

Sakata J., Uyeda K. (1990) Bovine heart fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: complete aminoacid sequence and localization of phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4951-4955.

Sakata J., Abe Y., Uyeda K. (1991). Molecular cloning of the DNA and expression and characterization of rat testes fructose-6-phosphate,2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 266: 15764-15770.

Salgado M.C., Metón I., Egea M., Baanante I.V. (2004). Transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish, *Sparus aurata*. *J. Mol. Endocrinol.* 33 (3): 783-95.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Samson S.L., Wong N.C. (2002). Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* 29(3): 265-79.

- Sandberg MB, Fridriksson J, Madsen L, Rishi V, Vinson C, Holmsen H, Berge RK, Mandrup S.** (2005). Glucose-induced lipogenesis in pancreatic beta-cells is dependent on SREBP-1. *Mol Cell Endocrinol.* 240(1-2): 94-106.
- Sakurai, T., Johnson, J. H., Uyeda, K.** (1996). Islet fructose 6-phosphate,2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase: isozymic form, expression, and characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 159-163.
- Sapetschnig A., Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H, Doll A, Schergaut M, Melchior F, Suske G.** (2002). Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J.* 21: 5206-5215.
- Sapetschnig A., Koch F., Rischitor G., Mennenga T., Suske G.** (2004). Complexity of translationally controlled transcription factor Sp3 isoform expression. *J Biol Chem.* 279 (40): 42095-105.
- Sarabu R., Grimsby J.** (2005). Targeting glucokinase activation for the treatment of type 2 diabetes--a status review. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 8(5):631-7. Review.
- Sato R., Yang J., Wang X., Evans M.J., Ho Y.K., Goldstein J.L., Brown M.S.** (1994). Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1). *J. Biol. Chem.* 269 (25): 17267-73.
- Sato R., Inoue J., Kawabe Y., Kodama T., Takano T., Maeda M.** (1996). Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.* 271 (43): 26461-4.
- Sawka-Verhelle D., Tartare-Deckert S., Decaux J-F., Girard J., Van Obberghen E.** (2000). Stat 5B, activated by insulin in a Jack-independent fashion, plays a role in glucokinase gene transcription. *Endocrinology.* 141: 1977-1988.
- Seoane J., Gómez-Foix A.M., O'Doherty R.M., Gómez-Ara C., Newgard C.B. Guinovart J.J.** (1996) Glucose-6-phosphate produced by glucokinase, but not hexokinase I, promotes the activation of hepatic glycogen synthase. *J. Biol. Chem.* 271: 23756-23760.
- Seoane J., Barberà A., Télémaque-Potts S., Newgard, C.B., Guinovart J.J.** (1999) Glucokinase overexpression restores glucose utilization and storage in cultured hepatocytes from male Zucker diabetic fatty rats. *J. Biol. Chem.* 274: 31833-31838.
- Schäfer D., Hamm-Künzelman B., Hermfisse U., Brand K.** (1996). Differences in DNA-binding efficiency of Sp1 to aldolase and pyruvate kinase promoter correlate with altered redox states in resting and proliferating rat thymocytes. *FEBS Lett.* 391: 35-58.
- Schäfer D., Hamm-Künzelman B., Brand K.** (1997). Glucose regulates the promotor activity of aldolase A and pyruvate kinase M₂ via dephosphorylation of Sp1. *FEBS Lett.* 417: 325--328.
- Schuit F.C., Huypens P., Heimberg H., Pipeleers D.G.** (2001). Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes.* 50(1): 1-11.
- Schohy S., Gabant P., Van Reeth T., Hertveldt V., Dreze P.L., Van Vooren P., Riviere M., Szpirer J., Szpirer C.** (2000). Identification of KLF13 and KLF14 (Sp6), novel members of the Sp/XKLF transcription factor family. *Genomics.* 70: 93-101.
- Scott D.K., Collier J.J., Doan T.T., Bunnell A.S., Daniels M.C., Eckert D.T., O'Doherty R.M.** (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(1-2):327-37.
- Sharma C., Manjeshwar R., Weinhouse S.** (1964). Hormonal and dietary regulation of hepatic glucokinase. *Adv. Enzyme Regul.* 2: 189-200.
- Shelton K. D., Franklin A. J., Khor A., Beechem J., Magnuson M. A.** (1992) Multiple elements in the upstream glucokinase promoter contribute to transcription in insulinoma cells. *Mol. Cell Biol.* 10: 4578-4589.

- Sheng Z., Otani H., Brown M.S., Goldstein J.L.** (1995). Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92 (4): 935-8.
- Shikata T., Kheyyali D., Shimeno S.** (1993) Effect of feeding rates on hepatopancreatic enzymes and body composition in common carp. *Bull. Jpan. Soc. Sci. Fish.* 59(5): 835-839.
- Shimano H., Horton J.D., Shinomura I., Hammer R.E., Brown M.S., Goldstein J.L.** (1997). Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99: 846-854.
- Shimeno S., Ming D.C., Takeda M.** (1993). Metabolic response to dietary carbohydrate to lipid ratios in *Oreochromis niloticus*. *Bull. Jpan. Soc. Sci. Fish.* 59(5): 827-833.
- Shimeno S., Hosokawa H., Takeda M.** (1996). Metabolic response of juvenile yellowtail to dietary carbohydrate to lipid ratios. *Fisheries Science.* 62(6): 945-949.
- Shimeno S., Shikata T., Hosokawa H., Masumoto T., Kheyyali D.** (1997). Metabolic response to feeding rates in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture.* 151: 371-377.
- Shimomura I., Shimano H., Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S.** (1997). Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99:838-845.
- Shimomura I., Bashmakov Y., Ikemoto S., Horton J.D., Brown M.S., Goldstein J.L.** (1999). Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 96: 13656-13661.
- Shin D.J., Osborne T.F.** (2003). Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2 (SREBP-2). *J. Biol. Chem.* 278 (36): 34114-8.
- Shin J.S., Torres T., Catlin R.L., Donahue E.P., 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 (4): R1381-90.
- Shiota C., Coffey J., Grimsby J., Grippo J., 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.
- Shiota M., Moore M.C., Galassetti P., Monohan M., Neal D.W., Shulman G.I., Cherrington A.D.** (2002). Inclusion of low amounts of fructose with an intraduodenal glucose load markedly reduces postprandial hyperglycemia and hyperinsulinemia in the conscious dog. *Diabetes.* (2):469-78.
- Shiraishi A., Yamada Y., Tsuura Y., Fijimoto S., Tsukiyama K., Mukai E., Toyoda Y., Miwa I., Seino Y.** (2001). A novel glucoquinase regulator in pancreatic β cells. *J. Biol. Chem.* 276: 2325-2328.
- Sibrowski W., Staegemann U., Seitz H.J.** (1982). Accelerated turnover of hepatic glucokinase in starved and streptozotocin-diabetic rat. *Eur J Biochem.* 127(3):571-4.
- Sibrowski W., Seitz H.J.** (1984). Rapid action of insulin and cyclic AMP in the regulation of functional messenger RNA coding for glucokinase in rat liver. *J. Biol. Chem.* 259: 343-346.
- Sjøttem E., Anderssen S., Johansen T.** (1996). The promoter activity of long terminal repeats of the HERV-H family of human retrovirus-like elements is critically dependent on Sp1 family proteins interacting with a GC/GT box located immediately 3' to the TATA box. *J. Virol.* 70 (1): 188-98.
- Slawson C., Hart G.W.** (2003). Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13: 631-636.

- Slawson C., Zachara N.E., Vosseller K., Cheung W.D., Lane M.D., Hart G.W.** (2005). Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 280: 32944-32956.
- Smale S.T., Schmidt M.C., Berk A.J., Baltimore D.** (1990). Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (12): 4509-13.
- Smith E.D., Langer S., Chaodong W., Balstrusch S., Okar D.A.** (2007). Molecular coordination of hepatic glucose metabolism by the 6-phosphofructo-2-kinase/fructode-2,6-biphosphatase: glucokinase complex. *Mol Endocrinol.* 21: 1478-1487.
- Soengas J.L., Polakof S., Chen X., Sangiao-Alvarellos, Moon T.W.** (2006). Glucokinase and hexokinase expression and activities in *rainbow trout* tissues: changes with food deprivation and refeeding. *Am J Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291: 810-821.
- Solomon S.S., Palazzolo M.R., Takahashi T., Raghov R.** (1997). Insulin stimulates rat calmodulin I gene transcription through activation of Sp1. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 109: 470-477.
- Sols A., Salas M., Vinuela E.** (1964). Induced biosynthesis of liver glucokinase. *Adv. Enzyme. Regul.* 2: 177-188.
- Spence J.T.** (1983). Levels of translatable mRNA coding for rat liver glucokinase. *J. Biol. Chem.* 258: 9143-9146.
- Spence JT, Koudelka AP** (1984). Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 259(10):6393-6.
- Spengler M.L., Kennett S.B., Moorefield K.S., Simmons S.O., Brattain M.G., Horowitz J.M.** (2005). Sumoylation of internally initiated Sp3 isoforms regulates transcriptional repression via a Trichostatin A-insensitive mechanism. *Cell Signal.* 17 (2): 153-66.
- Spengler M.L., Brattain M.G.** (2006). Sumoylation inhibits cleavage of Sp1 N-terminal negative regulatory domain and inhibits Sp1-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 281(9):5567-74.
- Satate of World aquaculture 2006. FAO Fisheries Technical Paper 500. Food and Aquaculture Organization of the United Nations. Roma, 2006.
- Steffensen K.R., Gustafsson J-A.** (2004). Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes.* 53: S36-S42.
- Stoekman A.K., Towle H.C.** (2002). The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *J. Biol. Chem.* 277 (30): 27029-35.
- Stoffel M., Froguel Ph., Takeda J., Zouali H., Vionnet N., Nishi S., Weber I.T., Harrison R.W., Pilkis S. J., Lesage S., Vaxillaire M., Velho G., Sun F., Iris F., Passa Ph., Cohen D., Bell G.I.** (1992). Human glucokinase gene: isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type2) diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 7698-7702.
- Storer A. C., Cornish-Bowden A.** (1976). Kinetics of rat liver glucokinase. Co-operative interactions with glucose at physiologically significant concentrations. *Biochem. J.* 159: 7-14.
- Storer A. C., Cornish-Bowden A.** (1977). Kinetic evidence for a "mnemonical" mechanism for rat liver glucokinase. *Biochem. J.* 165: 61-69.
- Stubbs M., Aiston S., Agius L.** (2000). Subcellular localization, mobility, and kinetic activity of glucokinase in glucose-responsive insulin-secreting cells. *Diabetes.* 49(12):2048-55.

Suárez M. D., Hidalgo M. C., García Gallego M., Sanz A., de la Higuera M. (1995) Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the european eel. *Comp. Biochem. Physiol.* 111A: 421-428.

Su K., Roos M.D., Yang X., Han I., Paterson A.J., Kudlow J.E., 1999. An N-terminal region of Sp1 targets its proteasome-dependent degradation in vitro. *J. Biol. Chem.* 274: 15194-15202.

Suske G. (1999) The Sp-family of transcription factors. *Review. Gene.* 238: 291-300.

Suske G., Bruford E., Philipson S. (2005). Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics.* 85(5): 551-6.

Sweet I., Matschinsky F.M. (1995) Mathematical model of beta-cell glucose-metabolism and insulin release.I. Glucokinase as glucosensor hypothesis. *Am. J. Physiol.* 268: E775-E778.

T

Takaishi K., Duplomb L., Wang M.Y., Li J., Unger R.H. (2004). Hepatic insig-1 or -2 overexpression reduces lipogenesis in obese Zucker diabetic fatty rats and in fasted/refed normal rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101 (18): 7106-11.

Tanese N., Saluja D., Vassallo M.F., Chen J.L., Admon A. (1996). Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFIII130 and hTAFIII100. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(24): 13611-6.

Tanizawa Y., Koranyi L. I., Welling C. M., Permutt M. A. (1991) Human liver glucokinase gene: cloning and sequence determination of two alternatively spliced cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7294-7297.

Teerijoki H., Krasnov A., Pitkanen T.I., Molsa H. (2000). Cloning and characterization of glucose transporter in teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochim. Biophys. Acta.* 1494: 290-294.

Teerijoki H., Krasnov A., Gorodilov Y., Krishna S., Molsa H. (2001). Rainbow trout glucose transporter (OnmyGlut1): functional assessment in (*Xenopus laevis*) oocytes and expression in fish embryos. *J. Exp. Biol.*, 204: 2667-2673.

Terauchi Y., Sakura H., Yasuda K., Iwamoto K., Takahashi N., Ito K., Kasai H., Suzuki H., Ueda O., Kamada N. (1995). Pancreatic beta-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *J Biol Chem.* 270 (51): 30253-6

Thorens B. (1993). Facilitated glucose transporters in epithelial cells. *Annu Rev Physiol.* Review. 55: 591-608.

Thorpe A, Ince BW. (1976). Plasma insulin levels in teleosts determined by a charcoal-separation radioimmunoassay technique. *Gen Comp Endocrinol.* 30 (3): 332-9.

Tiedge M., Steffek H., Elsner M., Lenzen S. (1999) Metabolic regulation, activity state, and intracellular binding of glucokinase in insulin-secreting cells. *Diabetes.* 48: 514-523.

Tippett P.S., Neet K.E. (1982a) An allosteric model for the inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.* 257: 12846-12852.

Tippett P.S., Neet K.E. (1982b) Specific inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzymes A below the critical micelle concentration. *J. Biol. Chem.* 257: 12839-12845.

Tontonoz P., Kim J.B., Graves R.A., Spiegelman B.M. (1993). ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol.* 13 (8): 4753-9.

Topping D.L., Mayes P.A. (1976). Comparative effects of fructose and glucose on the lipid and carbohydrate metabolism of perfused rat liver. *Br J Nutr.* 36(1):113-26.

Toth J.I., Datta S., Athanikar J.N., Freedman L.P., Osborne T.F. (2004). Selective coactivator interactions in gene activation by SREBP-1a and -1c. *Mol. Cell Biol.* 24 (18): 8288-300.

Toyoda Y., Miwa I., Kamiya M., Ogiso S., Nonogaki T., Aoki S., Okuda J. (1994) Evidence for glucokinase translocation by glucose in rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204: 252-256.

Toyoda Y., Miwa I., Satake S., Anai M., Oka Y. (1995). Nuclear localization of the regulatory protein of glucokinase in rat liver and translocation of the regulator to the cytoplasm in response to high glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215: 467-473.

Toyoda Y., Yoshie S., Shironoguchi H., Miwa I. (1999). Glucokinase is concentrated in insulin-secretory granules of pancreatic B-cells. *Histochem Cell Biol.* 112(1):35-40.

Tranulis, M. A., Dregni, O., Christophersen, B., Krogdahl, A., Borrebaek, B. (1996) A glucokinase-like enzyme in the liver of atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp. Biochem. Physiol.* 114B, 35-39.

Tsuchiya Y., Uyeda K. (1994) Bovine heart fructose 6-P, 2-kinase: fructose 2,6-bisphosphatase mRNA and gene structure. *Arch. Biochem. Biophys.* 310: 467-474.

U

Udvardia A.J., Templeton D.J., Horowitz J.M. (1995). Functional interactions between the retinoblastoma (Rb) protein and Sp-family members: superactivation by Rb requires amino acids necessary for growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(9): 3953-7.

Ullman K. S., Powers M. A., Forbes D. J. (1997). Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell.* 90(6):967-70.

V

Valera A., Pujol A., Gregori X., Riu E., Visa J., Bosch F. (1995). Evidence from transgenic mice that myc regulates hepatic glycolysis. *FASEB J.* 9: 1067-1078.

Van Schaftingen E., Hers H. (1981). Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 2861-2863.

Van Schaftingen E. (1989a). 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.

Van Schaftingen E., Vandercarmmen A. (1989b). Stimulation of glucose phosphorylation by fructose in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 179: 173-177.

Van Schaftingen E., Vandercarmen A., Dethoux M., Davies D.R. (1992). The regulatory protein of liver glucokinase. *Advan. Enzyme Regul.* 32: 133-148.

Van Schaftingen E., Dethoux M., Veiga da Cunha M. (1994). Short-term regulation of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *FASEB J.* 8: 414-419.

Van Schaftingen E., Veiga-da-Cunha M (2004). Discovery and role of glucokinase regulatory protein. *In glucokinase and glycemic disease: from basics to novel therapeutics. Front Diabetes.* Vol 16. Matchinsky F.M., Magnuson M.A., Eds. Basel, Karger. 193-207.

- Vandercammen A., Van Schaftingen E.** (1990). The mechanism by which rat liver glucokinase is inhibited by the regulatory protein. *Eur J Biochem.* 191(2):483-9.
- Vandercammen A., Van Schaftingen E.** (1991). Competitive inhibition of liver glucokinase by its regulatory protein. *Eur. J. Biochem.* 200: 545-551.
- Vandercammen A., Van Schaftingen, E.** (1993) Species and tissue distribution of the regulatory protein of glucokinase. *Biochem, J.* 294: 551-556.
- Vanhoutte C., Sener A., Malaisse W.J.** (1997). Subcellular distribution of hexokinase isoenzymes in pancreatic islets cells exposed to digitonin after incubation at a low or high concentration of D-glucose. *Mol Cell. Biochem.* 175: 131-136.
- Vanhoutte C., Malaisse W.J.** (1998). Energy-dependent intraellular translocation of glucokinase in rat pancreatic islets. *Mol Genet Metab.* 63: 172-176.
- Vázquez-Illanes, M.D., Ramos-Martínez, J.I** (1991) Phosphorylation-activated 6-phosphofructo-2-kinase from mantle tissue of marine mussels. *FEBS Lett.* 295: 176-178.
- Vázquez-Illanes, M.D., Barcia, R., Ibarguren, I., Villamarín, J.A., Ramos-Martínez, J.I.** (1992) Regulation of fructose-2,6-bisphosphate content in mantle tissue of the sea mussel *Mytilus gallo provincialis*. *Mar. Biol.* 112: 277-281.
- Vaulont S., Munnich A., Decaux J.F., Kahn A.** (1986) Transcriptional and posttranscriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. *J. Biol. Chem.* 261: 7621-7625.
- Veiga-da-Cunha M., Detheux M., Watelet N., Van Schaftingen E.** (1994). Cloning and expression of a *Xenopus* liver cDNA encoding a fructose-phosphate-insensitive regulatory protein of glucokinase. *Eur.J. Biochem.* 225: 43-51.
- Veiga-da-Cunha, M., Courtois, S., Michel, A., Gosselain, E., Van Schaftingen, E.** (1996a) Amino acid conservation in animal glucokinases. *J. Biol. Chem.* 271: 6292-6297.
- Veiga-da-Cunha M., Xu L.Z., Lee Y.H., Marotta D., Pilkis S.J. Van Schaftingen E.** (1996b). Effect of mutations on the sensitivity of human beta-cell glucokinase to liver regulatory protein. *Diabetologia.* 39: 1173.-1179.
- Veiga-da-Cunha M., Van Schaftingen E.** (2001). Identification of fructose-6-phosphate and fructose 1-phosphate-binding residues in the regulatory protein of glucokinase. *J. Biol. Chem.* 277: 8466-8473.
- Velho G., Froguel P.** (1997). Maturity-onset diabetes of the young (MODY), MODY genes and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 2:34-7. Review.
- Velho G., Froguel P. Gloyn A., Hattersley A** (2004). Maturity onset diabetes of the young type 2. *In glucokinase and glycemic disease: from basics to novel therapeutics. Front Diabetes.* Vol 16. Matchinsky F.M., Magnuson M.A, Eds. Basel, Karger. 42-64.
- Venepally P., Waterman M.R.,** (1995) Two Sp1-binding sites mediate cAMP-induced transcription of the bovine CYP11A gene through the protein kinase A signaling pathway. *J Biol Chem.* 270(43):25402-10.
- Ventura F., Rosa J. L., Ambrosio S., Gil J., Bartrons R.** (1991). 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in rat brain. *Biochem. J.* 276: 455-460.
- Vidal H., Crépin K.M., Rider M. H., Hue L., Rousseau G.G.** (1993). Cloning and expression of novel isoforms of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from bovine heart. *FEBS Lett.* 330: 329-333.

Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, Zouali H, Lesage S, Velho G, Iris F, Passa P. (1992). Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 356(6371): 721-2.

Virkamaki A., Ueki K., Kahn C.R. (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 103(7): 931-43. Review.

W

Wang H., Iynedjian P.B. (1997a) Acute glucose intolerance in insulinoma cells with unbalanced overexpression of glucokinase. *J. Biol. Chem.* 272: 25731-25735.

Wang H., Iynedjian P. B. (1997b) Modulation of glucose responsiveness of insulinoma β -cells by graded overexpression of glucokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 4372-4377.

Wang H., Liu F., Millette C.F., Kilpatrick D.L. (2002). Expression of a novel, sterol-insensitive form of sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) in male germ cells suggests important cell- and stage-specific functions for SREBP targets during spermatogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 22: 8478-90.

Wang H., San Agustin J.T., Witman G.B., Kilpatrick D.L. (2004). Novel role for a sterol response element binding protein in directing spermatogenic cell-specific gene expression. *Mol. Cell Biol.* 24 (24): 10681-8.

Wang X., Sato R, Brown M.S., Hua X., Goldstein J.L (1994) SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell.* 77: 53-62.

Watada H., Kajimoto Y., Umayahara Y., Matsuoka T., Kaneto H., Fujitani Y., Kamada T., Kawamori R., Yamasaki Y. (1996). The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. *Diabetes.* (11):1478-88.

Watanabe F., Sakai A., Furuya E., Uyeda K. (1994) Molecular cloning and tissue specific expression of fructose 6-phosphate,2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase of rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198: 335-340.

Watford M. (2002). Small amounts of dietary fructose dramatically increase hepatic glucose uptake through a novel mechanism of glucokinase activation. *Nutr Rev.* 60(8):253-7.

Weinhouse S. (1976). Regulation of glucokinase in liver. *Curr Top Cell Regul.* 11: 1-50.

Wilson, R. P. (1994) Utilization of dietary carbohydrate by fish. Review. *Aquaculture.* 124: 67-80.

Wimmer E.A., Jackle H., Pfeifle C., Cohen S.M. (1993). A Drosophila homologue of human Sp1 is a head-specific segmentation gene. *Nature.* 366: 690-694

Wu C., Khan S.A., Peng L-J, 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. *Adv Enzyme Regul.* 46:72-88.

Wu C., Okar D.A., Newgard C.B., Lange A.J. (2001). Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose2,6-bisphosphatase in mouse liver lowers blood glucose by suppression of hepatic glucose production. *J. Clin. Invest.* 107: 91-98.

Wu C., Okar D.A., Newgard C.B., Lange A.J. (2002). Increasing fructose-2,6-bisphosphate overcomes hepatic insulin resistance of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282: E38-E45.

Wu C., Okar D.A., Stoeckman A.K., Peng L-J, Herrera A.H., Herrera J.E., Towle H.C., Lange A.J., (2004). A potential role for fructose-2,6-bisphosphate in the stimulation of hepatic glucokinase gene expression. *Endocrinology.* 145 (2): 650-658.

Y

Yabe D., Brown M.S., Goldstein J.L. (2002a). Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(20):12753-8.

Yabe D., Xia Z.P., Adams C.M., Rawson R.B. (2002b). Three mutations in sterol-sensing domain of SCAP block interaction with insig and render SREBP cleavage insensitive to sterols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99 (26): 16672-7.

Yabe D., Komuro R., Liang G., Goldstein J.L., Brown M.S. (2003). Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100 (6): 3155-60.

Yahagi N., Shimano H., Hasty A.H., Amemiya-Kudo M., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Shionoiri F., Ohashi K., Osuga J., Harada K., Gotoda T., Nagai R., Ishibashi S., Yamada N. (1999). A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 274 (50): 35840-4.

Yajima S., Lee S.H., Minowa T., Mouradian M.M. (1998). Sp family transcription factors regulate expression of rat D2 dopamine receptor gene. *DNA Cell Biol.* 17(5):471-9.

Yamamoto T., Shimano H., Nakagawa Y., Ide T., Yahagi N., Matsuzaka T., Nakakuki M., Takahashi A., Suzuki H., Sone H., Toyoshima H., Sato R., Yamada N. (2004). SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes. *J Biol Chem.* 279 (13): 12027-35.

Yang T., Espenshade P.J., Wright M.E., Yabe D., Gong Y., Aebersold R., Goldstein J.L., Brown M.S. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell.* 110 (4): 489-500.

Yang X., Su K., Roos M.D., Chang Q., Paterson A.J., Kudlow J.E. (2001). O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (12): 6611-6.

Ye X., Liu S.F. (2002). Lipopolysaccharide down-regulates Sp1 binding activity by promoting Sp1 protein dephosphorylation and degradation. *J. Biol. Chem.* 277: 31863-31870.

Yellaturu C.R., Deng X., Cagen L.M., Wilcox H.G., Park E.A., Raghov R., Elam M.B. (2005). Posttranslational processing of SREBP-1 in rat hepatocytes is regulated by insulin and cAMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332 (1): 174-80.

Yieh L., Sanchez H.B., Osborne T.F. (1995). Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(13):6102-6.

Yoshida K., Murao K., Imachi H., Cao W.M., Yu X., Li J., Ahmed R., Kitanaka N., Wong N., Unterman T., Magnuson M., Ishida T. (2007). Pancreatic glucokinase is activated by insulin-like growth factor-I. *Endocrinology.* 148: 2904-13.

Yoshikawa T., Shimano H., Amemiya-Kudo M., Yahagi N., Hasty A.H., Matsuzaka T., Okazaki H, Tamura Y., Iizuka Y, Ohashi K., Osuga J., Harada K, Gotoda T., Kimura S., Ishibashi S., Yamada N. (2001). Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol. Cel. Biol.* 21: 2991-3000.

Yu J.H., Schwartzbauer G., Kazlman A., Menon R.K. (1999). Role of the Sp family of transcription factors in the ontogeny of growth hormone receptor gene expression. *J. Biol. Chem.* 274 (48): 34327-36.

Yu B., Datta P.K., Bagchi S. (2003). Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites. *Nucleic Acids Res.* 31: 5368-6376.

Z

Zelent D., Najafi H., Odili S., Buettger C., Weik-Collins H., Li C., Doliba N., Grimsby J., Matschinsky F.M. (2005). Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas. *Biochem Soc Trans.* 33: 306-310.

Zelent D., Golson M.L., Koeberlein B., Quintens R., Lommel L.V., Buettger C., Weik-Collins H., Taub R., Grimsby J., Schuit F., Kaestner K.H., Matschinsky F.M. (2006). A glucose sensor role for glucockinase in anterior pituitary cells. *Diabetes.* 55: 1953-1929.

Zhang W., Patil S., Chauhan B., Guo S., Powell D., Le J., Klotsas A., Matika R., Xiao X., Franks R., Heidenreich A., Sajan M.P., Farese R., Stolz D., Tso P., Koo S-H, Montminy M., Unterman T.G. (2006). Foxo-1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic and lipogenic gene expression. *J. Biol. Chem.* 281 (15): 10105-17.

Zhang Y., Hillgartner F.B. (2004). Starvation and feeding a high-carbohydrate, low-fat diet regulate the expression sterol regulatory element-binding protein-1 in chickens. *J. Nutr.* 134(9):2205-10.

Zhang Z., Wu R.S.S., Mok H.O.L., Wang Y., Poon W.W.L., Cheng S.H., Kong R.Y.C. (2003). Isolation, characterization and expression analysis of a hypoxia-responsive glucose transporter gene from the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Eur. J. Biochem.* 270: 3010-3017.

Zhang Z., Shin D.J., Osborne T.F. (2005). A simple promoter containing two Sp1 sites control the expression of sterol-regulatory-element-binding protein 1a (SREBP-1a). *Biochem J.* 386: 161-8.

Zhao J., Cao Y., Zhao C., Postlethwait J., Meng A. (2003). An Sp1-like transcription factor Spr2 acts downstream of Fgf signaling to mediate mesoderm induction. *EMBO J.* 22: 6078-6088.

Zheng X.L., Matsubara S., Diao C., Hollenberg M.D., Wong N.C. (2000). Activation of apolipoprotein AI gene expression by protein kinase A and kinase C through transcription factor, Sp1. *J. Biol. Chem.* 275 (41): 31747-54.

Zheng X.L., Matsubara S., Diao C., Hollenberg M.D., Wong N.C. (2001). Epidermal growth factor induction of apolipoprotein A-I is mediated by the Ras-MAP kinase cascade and Sp1. *J. Biol. Chem.* 276 (17): 13822-9.

Zhu Q., Liao K. (2000). Differential expression of the adipocyte amino acid transporter is transactivated by Sp1 and SP3 during the 3T3-L1 preadipocyte differentiation process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271(1):100-6.

Zhu Y.Y., Machleder E.M., Chenchik A., Li R., Siebert P.D. (2001). Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques.* 30 (4): 892-7.

Zitzer H., Wente W., Brenner M.B., Sewing S., Buschard K., Gromada J., Efanov A.M. (2006). Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology.* 147 (8): 3898-905.

Zorzano A., James D.E., Ruderman N.B., Pilch P.F. (1988) Insulin-like growth factor 1 binding and receptor kinase in red and white muscles. *FEBS Lett.* 234: 257-262.

ANNEX: LLISTAT DE PUBLICACIONS

Articles indexats:

1. **Egea M., Metón I., Córdoba M., Fernández F., Baanante I.V.** (2007). Role of SREBP-1a and Sp1 in the insulin-mediated regulation of glucokinase transcription in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Sotmès al *General and Comparative Endocrinology*. Índex d'impacte segons el *Journal of Citation Reports* (2005): 2,29.
2. **Egea M., Metón I., Baanante I.V.** (2007). Sp1 and Sp3 regulate glucokinase gene transcription in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Molecular Endocrinology*. 38: 481-492. Índex d'impacte segons el *Journal of Citation Reports* (2005): 2,474.
3. **Metón I., Egea M., Anemaet I.G., Fernández F., i Baanante I.V.** (2006). Sterol Regulatory Element Binding Protein-1a Transactivates 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase Gene Promoter. *Endocrinology*. 147: 3446- 3456. Índex d'impacte segons el *Journal of Citation Reports* (2005): 5,313.
4. **Salgado M.C., Metón I., Egea M., i Baanante I.V.** (2004). Transcriptional Regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish, *Sparus aurata*. *Journal of Molecular Endocrinology*. 33: 783-795. Índex d'impacte segons el *Journal of Citation Reports* (2004): 3,855.
5. **Metón I., Egea M., Fernández F., Eraso M.C., i Baanante I.V.** (2004). The N-terminal sequence directs import of mitochondrial alanine aminotransferase into mitochondria. *FEBS Letters*. 566: 251-254. Índex d'impacte segons el *Journal of Citation Reports* (2004): 3,843.
6. **Caseras A., Metón I., Vives C., Egea M., Fernández F., i Baanante I.V.** (2002). Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition*. 88: 607-614. Índex d'impacte segons el *Journal of Citation Reports* (2002): 2,491.

Capítol de llibre:

1. **Metón I., Egea M., i Baanante I.V.** (2003). New insights into the regulation of hepatic metabolism in fish. A: *Recent Research Advances in Biochemistry*. 4: 125-149. Capítol de llibre.

LLISTAT DE PUBLICACIONS

Egea M., Metón I., Baanante I.V. (2007). Sp1 and Sp3 regulate glucokinase gene transcription in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Molecular Endocrinology*. 38: 481-492.

Metón I., Egea M., Anemaet I.G., Fernández F., i Baanante I.V. (2006). Sterol Regulatory Element Binding Protein-1a Transactivates 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase Gene Promoter. *Endocrinology*. 147: 3446- 3456.

Salgado M.C., Metón I., Egea M., i Baanante I.V. (2004). Transcriptional Regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish, *Sparus aurata*. *Journal of Molecular Endocrinology*. 33: 783-795.

Metón I., Egea M., Fernández F., Eraso M.C., i Baanante I.V. (2004). The N-terminal sequence directs import of mitochondrial alanine aminotransferase into mitochondria. *FEBS Letters*. 566: 251-254.

Metón I., Egea M., i Baanante I.V. (2003). New insights into the regulation of hepatic metabolism in fish. A: *Recent Research Advances in Biochemistry*. 4: 125-149.

Caseras A., Metón I., Vives C., Egea M., Fernández F., i Baanante I.V. (2002). Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition*. 88: 607-614.