



Programa de Doctorat de BIOMEDICINA  
Bienni 2000-2002

# **Validació de la PEPCK-C hepàtica com a diana en la teràpia de la diabetis**

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

Alicia García Gómez-Valadés

José Carlos Perales Losa

Memòria presentada per Alicia García Gómez-Valadés  
per a optar a grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

L'Hospitalet de Llobregat, maig de 2008



*No tenía miedo a las dificultades.  
Lo que le asustaba era la obligación  
de tener que escoger un camino.*

*Escoger un camino significaba abandonar otros.*

*El Alquimista*  
Paulo Coelho



*There's no place like home.*

*The wizard of Oz*  
L. Frank Baum

Gràcies....

Durant aquest temps que he dedicat a la tesi (i no ha estat poc) no només he après coses relacionades amb ciència, sinó que, per a mi el més important, he crescut molt com a persona. I tot gràcies a una pila de persones del més variat i plenes de matisos amb les que he tingut la sort de conviure durant aquests anys a la particular “Casa de la pradera” que és “Wellbeach” on, fins i tot en els seus capítols més “gore” ha resultat molt fàcil sentir-se com a casa i fer-me meves les coses. Per això m’agradaria enviar el més sincer agraïment a totes aquelles persones amb qui he conviscut aquests anys. Vull dir-vos GRÀCIES a tots, per aconseguir que en senti estimada, perquè aquest és el motor que ens mou a tots, no?...

Voldria destacar a algunes persones i personetes que, d’una manera o altra, han estat especialment importants per a mi i per a la arribada a bon port d’aquest meu projecte de tesi. *And the winner is...*:

El meu més sincer agraïment per al José Carlos. Per la teva infinita paciència, per demostrar-me per activa i per passiva la teva confiança en mi (més que jo mateixa, moltes vegades), per ensenyar-me cada dia una pila de coses: no només a fer ciència de la bona, sinó a ser persona. Gràcies pels teus consells sincers, per ser una font inesgotable de coneixement, per contagiar-me el teu entusiasme per la ciència, per donar-me llibertat en tot moment, per donar-me ales. Treballar colze a colze amb tu ha estat genial. Gràcies per ser el millor “jefe”.

Ja ho diuen: “al costat de tot gran home, hi ha una gran dona”, oi Maria?. Gràcies a tu també, per tot l’ajut que em vas oferir durant el temps que vam estar juntes al lab., per la teva dolçor i serenitat.

Si estiro del fil dels temps cap a enrere, la primera persona que va confiar en mi per a posar els peus dins del seu laboratori va ser la Dra. Anna M<sup>a</sup> Gómez-Foix. Gràcies Anna, a tu i a tots els *Adenos* per acollir-me com una més. Josepi, per ensenyar-me els misteris de “Güetenbló” i per acollir-me a Boston. Carles, per aquelles tardes a la campana de virus i per la optimitzada ruta “memorials”. Laia i Sandra, pels moments divertits i els concerts compartits.

Vull agrair al Dr. Ramón Bartrons que confiés en mi i em fes un forat en el seu laboratori. Gràcies Ramon pels consells i lliçons, per ensenyar-me a llegir entre línies.

També als meus companys i amics de Departament:

Primer de tot, els “Peralets”:

Anna, gràcies perquè treballar amb tu ha estat un plaer, no hi ha una companya millor. Gràcies per estar sempre quan et necessitava. Al Francesc X. Blasco, per ensenyar-me tantes i tantes coses, sort de tu amb els problemes informàtics. A la “colombiana mala”, que no lo es tanto; por esos ratitos de cháchara y por darme un empujoncito cuando lo necesité. También a las nuevas incorporaciones: Andy, gracias por echarme una mano en la reta final y contagiarme con tu entusiasmo renovado. Jana good luck in your spanish venture.

També als companys-veïns “Bioffsics”: Jordi Bermúdez i Teresa, Roser Jordi Boada i Edu Cuesta. Gràcies per la plàcida convivència.

Als “Bartronets”:

Tot i que va arribar el moment d'emigrar, sempre m'hi he sentit com a casa a Can Bartrons. Joanet, la nostra cadenera, el nostre poeta, la nostra *vedette*..., no canviïs mai. Marta, por esas cervecitas y tapitas a la que nos ayudaban a las dos para desahogar las penas. Mercè, gràcies per la bona ona que em transmets, per la teva sinceritat, espero no perdre mai la teva amistat. Gracias también a ti, Esther, porque has estado cuando te he necesitado, dentro y fuera del lab. Per suposat, a l'Àurea, el meu clon “number one” (posteriorment la colònia s'ha anat propagant, però això és una altra història). A tu t'he d'agrair una pila de coses, des dels teus ajuts als inicis de la meva tesi amb els clonatges a les vuit de la tarde, passant per aquelles memòries que em tocava fer sense tenir ni idea de per on començar, i fins a donar-me l'oportunitat de fer de clon-clon, sense ni un polimorfisme. També a l'Ana Manzano, per adoptar-me els meus primers dies a Wellbeach i posar-me les piles. A la Nieves, simplemente, por ser así de auténtica. También a los recién llegados: Miguel i Laura; ánimos!!

Als “Venturinis”:

Allí, al fondo a la izquierda hay un reducto de buen rollo donde siempre me he sentido como en casa, donde siempre he encontrado un alma caritativa que quiera ir a la “Pisu” a comer o abrir las orejas “de bat a bat” para escuchar mis dilemas vitales “volando voy, volando vengo...”. Pues eso, als meus col·leguis venturinis, des el propi Francesc Ventura, passant pel meu “carinyet” Francesc Vinyals i la resta de “deixebles”. Ay! Que me lío de idioma, es que estaba pensando en mi Antonio. También a Bea, Cris Lacasa (per fer-me un foradet al “office” de l'IRO), a l'Arnau i al Pol. Molt especialment a les meves nenes: Cris Gamell, Roser i M<sup>a</sup>José, por todo lo compartido y por compartir fuera del lab. Per ser tal i com sou.

Als “Gilians”

Aquests estan al fons a la dreta, amb ells m'hi sento com a casa. A tots, Dani, Llorenç, Antonio, Mercè, Anna M<sup>a</sup>, Diana, Camila. Gràcies, en lo científic, pel vostre “préstec” immunològic (em refereixo als mils de vegades que m'heu passat anticossos), i en lo personal, per ser tant macos. Als que ja no hi són: Montse i

Clara; i als nous: Alba, gràcies per aquella *fondue* de xocolata!!! Com no, al patró: Joan, per tenir r un grup tant maco. Pero sobretodo a ti, Antonio, gracias por todo, menos por los anticuerpos ;-). Por los cines y cervezas, las lecciones de escalada y no sé cuantas cosas más.

També als Fisiòlegs i Biòlegs Moleculars: Jordi Llorens, Pere, José Luis, Ouadah, Edu, Fabiola....

A l'Esther i el Benja, per la vostra inestimable ajuda amb els "chismes" dels SCT.

Al meus nous companys de Palau Pharma. Especialment a la secció "familia Telerín" Cristina (la mami), Jordi (el tete) i Maria (la nena), i al "patriarca", Luís. Per la vostra paciència i ànims en el tram final.

Como no, a mis "coleguis", científicos o no. A mi niña Rakel, gracias por esas interminables charlas psicoterapéuticas. To my friends beyond the ocean: Richard, Parvin, Kaushik, Alexandra, and the Steiner House family. Gracias a Cris, Olga y Judit, por prohibirme hablar de ciencia fuera del laboratorio. A los "Corretja": Greta, Jose, Abril y Nina, por los buenos ratos pasados, el buen rollo, las canciones matutinas de la "familia Trapp". Al *Jaume Atomb*, per aquell cap de setmana a La Fosca que mai oblidaré. A Ramón y Eli, por todo lo compartido y por escucharme hasta la saciedad mis líos mentales. También a Mamen (*alias* huevo Kinder) y Víctor, el Ferran Adrià del Baix Llobregat. A "les nenes", per aquelles tardes/nits que hem passat i pasarem. També a tots els col·leguis de la saleta del cafè. Per res del món em deixaria de portar tàper, només per dinar amb vosaltres, riure i parlar de "parxes", "anillos"... Uf, si les parets parlessin....

Gracias a *Dsignum*, por la parte gráfica de este manuscrito.

El apoyo de mi familia ha sido fundamental en todo momento. No hay palabras que expresen mi agradecimiento. A mis padres, porque soys los pilares de mi existencia. Gracias por vuestro apoyo incondicional en todos los proyectos de mi vida, porque siempre habéis estado ahí, porque siempre estaréis. Nada habría sido posible sin vosotros. También a mis hermanos, Ana, Esteban y Jesús. Gracias, tete, por intentar entender los misterios del genoma, no te preocupes, yo tampoco los entiendo. Casi me olvido! A mis sobrinos Rubén, Sofía y Jesús, por hacerme viajar en el tiempo a mi infancia.

Finalmente, gracias a la persona que ha vivido más de cera el "lado oscuro" de esta tesis. Gracias, Edu por mimarme y cuidarme, por capear el temporal hasta llegar a buen puerto, por tu paciencia en mis momentos de crispación, por compartir conmigo los subidones cuando obtenía un buen resultado y animarme en los momentos de bajón. Prueba superada.





---

## ABREVIATURES

---

<b>AAT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>AcAc</b>	Acetoacetat
<b>ACC</b>	Acetil-CoA carboxilasa
<b>Ad5</b>	Adenovirus del serotip 5
<b>ADP</b>	Adenosina 5'-difosfat
<b>AGL</b>	Àcids grassos lliures
<b><math>\alpha</math>-KG</b>	Alfa-cetoglutarat
<b>AMP</b>	Adenosina 5'-monofosfat
<b>AMPK</b>	Proteïna quinasa activada per AMP
<b>ATP</b>	Adenosina 5'-trifosfat
<b><math>\beta</math>-HBA</b>	Àcid beta-hidroxibutirat
<b>cAMP</b>	AMP cíclic
<b>C/EBP</b>	CAAT enhancer binding protein
<b>ChREBP</b>	Carbohydrate response element binding protein
<b>CoA</b>	Coenzim A
<b>COX</b>	Citocrom c oxidasa
<b>CPT-1</b>	Carnitina palmitoil transferasa-1
<b>CREBP</b>	cAMP response element binding protein
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DTE</b>	1,4-Ditioeritriol
<b>FAS</b>	Sintasa d'àcids grassos
<b>FBP</b>	Fructosa-1,6-bisfosfatasa
<b>FCCP</b>	Carbonil cianida p-trifluorometoxifenil-hidrazona)
<b>FOXA2</b>	Forkhead box A2
<b>FOXO1</b>	Forkhead box O1
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
<b>GC</b>	Glucocorticoids
<b>GDP</b>	Guanosina 5'-difosfat
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GK</b>	Glucoquinasa
<b>Gli-K</b>	Glicerol quinasa

<b>Glut</b>	Transportador de glucosa
<b>GNG</b>	Gluconeogènesi
<b>GPT</b>	Glutamat-piruvat transaminasa
<b>G6Pasa</b>	Glucosa-6-fosfatasa
<b>GSK3</b>	Glicogen sintasa quinasa 3
<b>GTP</b>	Guanosina 5'-triosfat
<b>HDL</b>	High density lipoprotein
<b>HK</b>	Hexoquinasa
<b>HNF4-<math>\alpha</math></b>	Hepatic nuclear factor 4- $\alpha$
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida d'alta resolució
<b>IDDM</b>	Insulin dependent diabetes mellitus (diabetis tipus I)
<b>IFN</b>	Interferó
<b>IGF1</b>	Insulin-like growth factor 1
<b>IPGPT</b>	Test intraperitoneal de producció de glucosa
<b>IPGTT</b>	Test intraperitoneal de tolerància a la glucosa
<b>IPITT</b>	Test intraperitoneal de tolerància a la insulina
<b>IRS</b>	Insulin receptor substrate
<b>LDH</b>	Lactat deshidrogenasa
<b>LDL</b>	Low density lipoprotein
<b>L-PK</b>	Piruvat quinasa hepàtica
<b>MDH</b>	Malat deshidrogenasa
<b>miRNA</b>	Micro RNA
<b>3-MPA</b>	Àcid 3-mercaptopicolínic
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotin adenin dinucleòtid, estat oxidat
<b>NADH</b>	Nicotin adenin dinucleòtid, estat reduït
<b>NIDDM</b>	Non-insulin dependent diabetes mellitus (diabetes tipus II)
<b>OAA</b>	Oxalacetat
<b>PC</b>	Piruvat carboxilasa
<b>PDH</b>	Piruvat deshidrogenasa
<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvat
<b>PEPCK- C</b>	Fosfoenolpiruvat carboxiquinasa citosòlica
<b>PEPCK- M</b>	Fosfoenolpiruvat carboxiquinasa mitocondrial
<b>PFK1</b>	Fosfofructoquinasa-1

<b>PFK2</b>	Fosfofructoquinasa-2
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	PPAR gamma coactivator 1 alpha
<b>PHG</b>	Producció hepàtica de glucosa
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3 quinasa
<b>PK</b>	Piruvat quinasa
<b>PKA</b>	Proteïna quinasa A
<b>PKC</b>	Proteïna quinasa C
<b>PKR</b>	Proteïna quinasa R
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator activated receptor
<b>RCR</b>	Relació de control de la respiració
<b>RCRP</b>	Relació de control de la fosforilació respiratòria
<b>RISC</b>	RNA induced silencing complex
<b>RNAi</b>	RNA d'interferència
<b>ROS</b>	Espècies reactives d'oxigen
<b>SDC1</b>	Esteroill-CoA desaturasa 1
<b>siRNA</b>	Small interference RNA
<b>SREBP-1c</b>	Sterol regulatory element binding protein 1c
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>TAB</b>	Teixit adipós blanc
<b>TAG</b>	Triacilglicèrids
<b>TZD</b>	Tiazolidinediones
<b>Poly(dI:dC)</b>	Poli(deoxiinosina:deoxicitosina)
<b>UCR</b>	Relació de control desacoblat
<b>VDAC</b>	Voltage dependent anion channel
<b>VLDL</b>	Very low density lipoprotein



---

## ÍNDIX DE CONTINGUTS

---

### INTRODUCCIÓ

#### DIABETIS MELLITUS

Etiopatogènesi i patofisiologia de la diabetis tipus I.....	- 3 -
Etiopatogènesi i patofisiologia de la diabetis tipus II.....	- 4 -
Mecanismes cel·lulars d'inducció de resistència a insulina per lípids.....	- 10 -
Malonil-CoA i AMPK, un duet regulador del metabolisme energètic: implicacions en la resistència a insulina.....	- 13 -
Dianes terapèutiques i fàrmacs antidiabètics.....	- 15 -

#### REGULACIÓ DE L'HOMEOSTASI ENERGÈTICA AL FETGE

Acció de la insulina sobre el fetge per al manteniment de l'homeòstasi de la glucosa.....	- 19 -
Gluconeogènesi hepàtica .....	- 22 -
Zonació metabòlica del fetge .....	- 25 -
Fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK).....	- 27 -

#### TRANSFERÈNCIA GÈNICA COM A EINA TERAPÈUTICA

Sistemes de transferència gènica .....	- 38 -
Productes de teràpia gènica al mercat.....	- 41 -
Aproximacions de teràpia gènica per la diabetis.....	- 41 -

#### RNA D'INTERFERÈNCIA

Mecanisme d'acció del RNA d'interferència: del dsRNA al siRNA .....	- 47 -
RNAi en mamífers: funcions biològiques i aplicació: siRNA i miRNA .....	- 48 -
Molècules efectores de RNAi en mamífers: siRNA vs shRNA.....	- 51 -
Disseny de seqüències efectores de siRNA .....	- 53 -
Efectes deleteris que poden associar-se a l'ús de RNAi en mamífers .....	- 55 -
RNAi in vivo .....	- 57 -
Aplicacions terapèutiques basades en RNA d'interferència .....	- 60 -

OBJECTIUS.....	- 63 -
----------------	--------

### RESULTATS

#### CAPÍTOL 1: Disseny de seqüències de shRNA i estudi de l'efecte sobre l'homeòstasi de la glucosa de la silenciació de PEPCK-C al fetge de ratolins diabètics en absència d'insulina

INTRODUCCIÓ.....	- 71 -
RESULTATS .....	- 72 -
Disseny i generació de vectors d'expressió de shRNA dirigits contra PEPCK-C .....	- 72 -
Silenciament de la PEPCK-C mitjançant shRNA in vitro .....	- 74 -

Avaluació de la funcionalitat dels vectors pSHAGs in vivo transduïts mitjançant la tècnica de transferència gènica hidrodinàmica .....	- 75 -
Silenciament específic de PEPCK-C endògena en animals sans .....	- 81 -
Silenciament de PEPCK en el fetge de ratolins diabètics .....	- 84 -
<b>DISCUSSIÓ</b> .....	- 95 -

**CAPÍTOL 2: Validació de PEPCK-C com a diana terapèutica: estudi de l'impacte metabòlic de la silenciació de PEPCK-C hepàtica en el context de la diabetis tipus II**

<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	- 101 -
<b>RESULTATS</b> .....	- 102 -
Silenciació gènica de PEPCK-C al fetge de ratolins diabètics db/db mediada per un vector adenoviral codificant per un shRNA específic.....	- 102 -
La transducció del fetge amb vectors adenovirals de shRNA no comporta toxicitat associada al vehicle ni a les seqüències de shRNA.....	- 103 -
La reducció del contingut de PEPCK-C hepàtica millora l'homeòstasi de la glucosa. ....	- 108 -
Regulació coordinada de la gluconeogènesi hepàtica.....	- 111 -
La reducció del contingut de PEPCK-C hepàtica millora la sensibilitat perifèrica a la glucosa i a la insulina.....	- 113 -
Conseqüències de la silenciació hepàtica de PEPCK-C sobre el metabolisme lipídic .....	- 118 -
Dissociació entre lipidosi hepàtica i resistència a insulina .....	- 119 -
Paper integrador de PEPCK-C en el metabolisme energètic .....	- 121 -
Mecanisme proposat.....	- 128 -
<b>DISCUSSIÓ</b> .....	- 136 -

<b>DISCUSSIÓ GENERAL</b> .....	- 151 -
--------------------------------	---------

<b>CONCLUSIONS</b> .....	- 163 -
--------------------------	---------

<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	- 217 -
---------------------------	---------

<b>PUBLICACIONS</b> .....	- 243 -
---------------------------	---------

**ADDENDUM:**

<b>TRANSFERÈNCIA GÈNICA NO VÍRICA MEDIADA PER RECEPTOR</b> .....	- 267 -
--	---------

---

## INTRODUCCIÓ

---





---

## DIABETIS MELLITUS

---

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

### **Etiopatogènesi i patofisiologia de la diabetis tipus I**

La diabetis tipus I (IDDM) es manifesta generalment abans dels 30 anys d'edat, freqüentment durant l'adolescència, i afecta entre el 5 i el 10% de la població diabètica. Es manifesta en hiperglucèmia i cetoacidosis secundàries a la manca d'insulina. La incapacitat dels teixits perifèrics per a captar i metabolitzar la glucosa, sumat a l'increment de la glicogenòlisi i gluconeogènesi hepàtica, contribueixen a la hiperglucèmia. Al teixit adipós la lipòlisi no està inhibida, fet que fa incrementar els nivells d'àcids grassos circulants. Aquests són captats i oxidats al fetge per a generar cossos cetònics, donant lloc a la cetoacidosis característica de la malaltia. Aquests cossos cetònics són utilitzats com a substrat energètic alternatiu a la glucosa pels teixits perifèrics (múscul, cervell, etc).

En la patogènia de la diabetis tipus I hi ha implicats tant factors ambientals com factors genètics. Una predisposició genètica fa als individus susceptibles de generar una resposta autoimmunitària contra antígens de la pròpia cèl·lula  $\beta$  (3). Hi ha una infiltració de macròfags i limfòcits T autoagressius als illots de Langerhans (insulinitis) que destrueix les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques, suprimint-ne la producció d'insulina i, en conseqüència, la capacitat dels teixits perifèrics de metabolitzar la glucosa. Estudis genètics han associat aquesta predisposició amb determinats loci del complex major d'histocompatibilitat (HLA), referits col·lectivament com IDDM1. Alguns dels factors ambientals que

s'han associat a la malaltia inclouen infeccions, substàncies químiques, o nutrients. Els símptomes de la malaltia apareixen quan quasi la totalitat de les cèl·lules  $\beta$  de l'illot de Langerhans estan destruïdes. Les cèl·lules  $\alpha$ , productores de glucago, les  $\delta$ , productores de somatostatina i les PP, productores de polipèptid pancreàtic, es preserven.

### **Etiopatogènesi i patofisiologia de la diabetis tipus II**

La diabetis tipus II (NIDDM) és la forma de diabetis més comú, amb una incidència del 90 al 95% en la població diabètica. Es manifesta en individus adults, generalment majors de 40 anys. Es caracteritza per la incapacitat dels teixits perifèrics per a respondre normalment a la insulina (resistència a la insulina), dificultant: a) la captació de glucosa, principalment al múscul i al fetge, b) la inhibició de la producció de glucosa al teixit hepàtic i c) la captació i reesterificació d'àcids grassos pel teixit adipós comportant, en últim terme, uns nivells anormalment elevats de glucosa en sang (hiperglucèmia). Com a efecte compensatori, per a mantenir la senyalització d'insulina en els teixits perifèrics, les cèl·lules  $\beta$  del pàncreas incrementen la secreció d'insulina fins que, finalment, el procés acaba amb la disfunció dels illots de Langerhans i diabetis oberta (4).

Estudis epidemiològics indiquen que hi ha una component genètica que predisposa al desenvolupament de resistència a insulina i diabetis tipus II, tot i que la complexitat genètica de la malaltia ha dificultat la identificació d'als lligats al desenvolupament de la resistència a insulina. El gruix de les investigacions es concentren en disseccionar la contribució a la patologia diabètica de diferents als a través de l'ús de models murins genosuprimits o transgènics amb alteracions monogèniques que afecten diferents punts de la via de transducció de senyal de la insulina. Els estudis de ratolins genosuprimits per al receptor de la insulina (Insr) i per als substrats d'insulina (Irs1 i Irs2) han fet palesa la naturalesa poligènica i heterogènia de la malaltia: mentre que els heterozigots Irs1<sup>+/-</sup> són normals, els heterozigots dobles mutants Insr/Irs1<sup>+/-</sup>, així com els Insr/Irs2<sup>+/-</sup> mostren la simptomatologia diabètica (5; 6), podent variar en un 80% la prevalència de la patologia, en funció del fons genètic de la soca murina emprada en els creuaments per a obtenir el doble heterozigot (7). A més dels factors genètics, factors ambientals també s'han relacionat amb el desenvolupament de resistència a insulina i diabetis tipus II, entre els que s'inclouen la dieta, obesitat i manca d'exercici.

Tot i que els factors primaris desencadenants de la malaltia es desconeixen, el que sí està clar és que la resistència a insulina té un paper fonamental en el seu desenvolupament. Les causes moleculars

desencadenants de la resistència a la insulina en els teixits perifèrics són diverses i només es coneixen parcialment. És difícil determinar quins defectes són primaris i quins conseqüències secundàries. L'alteració en el número de receptors, mutacions puntuals que afectin a la afinitat de la hormona pel receptor, alteracions de la via de transducció de la senyal d'insulina o dels mecanismes de captació i utilització de la glucosa són possibles factors determinants de la resistència a insulina. S'han associat diversos factors a la resistència a insulina en individus diabètics i obesos, com la hiperinsulinèmia, hiperglucèmia, nivells elevats d'àcids grassos plasmàtics, adipoquines o citoquines. Als individus diabètics, els principals òrgans afectats per la resistència a insulina són el teixit adipós, el múscul i el fetge; tot i que la contribució específica de cada òrgan a la hiperglucèmia no està clara. L'ús de models animals genosuprimits amb alteracions específiques de teixit ha permès dissecionar les contribucions individuals dels òrgans sensibles a insulina en la patogènia diabètica.

### **Resistència a insulina al teixit adipós**

La diabetis tipus II està molt freqüentment associada a la obesitat. Tot i que el teixit adipós contribueix només en un 5% aproximadament a l'aclarament de glucosa postpandrial, aquest teixit juga un paper molt important en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa i en la patofisiologia de la resistència a insulina. Aquest concepte l'evidència l'estudi de ratolins knock-out pel transportador de glucosa Glut4 al teixit adipós (8), el qual demostrà que la incapacitat del teixit adipós per captar glucosa repercuteix negativament en la sensibilitat a insulina als teixits perifèrics (fetge i múscul) a través de mecanismes encara no dilucidats. El teixit adipós contribueix a la patogènia diabètica de diferents maneres:

1. Als adipòcits, la resistència a insulina provoca un increment en l'activitat de la lipasa sensible a hormones (LSH), resultant en un increment de la taxa de lipòlisi. Com a conseqüència, s'eleva la concentració en la circulació d'àcids grassos (factor associat a la resistència a insulina tant al múscul com al fetge) i glicerol (substrat gluconeogènic pel fetge).
2. El teixit adipós actua com a un teixit endocrí i exerceix un paper integrador del metabolisme a través de la secreció de pèptids bioactius, anomenats adipoquines (leptina, adiponectina, resistina,  $TNF\alpha$ , IL6, etc), implicades en la regulació de l'homeòstasi energètica als teixits perifèrics i en estats d'inflamació. Una desregulació en la secreció d'aquestes adipoquines

podria exercir efectes importants sobre l'acció de la insulina al fetge i al múscul. Aquestes adipoquines són:

La **leptina** és una proteïna de 16 kDa secretada pel teixit adipós de forma proporcional a la seva massa. El receptor de la leptina es troba a l'hipotàlam, des d'on exerceix els seus efectes sobre els teixits perifèrics a través de les vies simpàtiques. La seva funció no és només regular l'aport d'energia, aportant sensació de sacietat, sinó que també fa una funció integrativa del metabolisme energètic. La leptina incrementa la sensibilitat del fetge a la insulina i l'oxidació d'àcids grassos al múscul. Els individus obesos, tot i tenir els nivells de leptina circulants incrementats, presenten resistència a la acció de la hormona. Diferents models animals de diabetis tipus II es basen en mutacions monogèniques espontànies en el gen de la leptina (ratolí ob/ob), o del seu receptor (ratolí db/db). Aquests animals, ja sigui pel dèficit de la hormona (ob/ob) o la manca de la transducció de la seva senyal (db/db), desenvolupen hiperfàgia, reducció de la despesa energètica, obesitat i resistència a insulina als teixits perifèrics.

L'**adiponectina** és una hormona secretada pels adipòcits. A més de tenir un efecte antiinflamatori, millora la sensibilitat a la insulina al fetge i al múscul esquelètic, estimula l'oxidació d'àcids grassos i disminueix la gluconeogènesi. En pacients diabètics tipus II o obesos, els nivells plasmàtics d'adiponectina disminueixen i correlacionen negativament amb la resistència hepàtica a la insulina.

La **resistina** és una hormona secretades pels pre-adipòcits en diferenciació a adipòcits madurs. Exerceix un efecte de desensibilització a la insulina, especialment sobre el fetge, estimulant la glicogenòlisi i la gluconeogènesi. És, a més, un potent agent pro-inflamatori. En pacients diabètics tipus II, els nivells de resistina estan incrementats i correlacionen amb la resistència a insulina al fetge.

El **factor de necrosi tumoral alfa** (TNF $\alpha$ ) és una citoquina derivada dels adipòcits que té un efecte bloquejant de la senyalització de la insulina a través de la fosforilació de IRS1 en residus de serina. El TNF $\alpha$  és un agent pro-inflamatori. Els nivells circulants de TNF $\alpha$  estan incrementats en individus obesos i en diabètics. En la resistència a insulina, per tant, hi ha una component d'inflamació sub-clínica.

La **interleuquina 6** (IL-6) és una citoquina pro-inflamatòria produïda, sobretot, pel teixit adipós visceral. Nivells incrementats de IL-6 estan associats a resistència a insulina en pacients diabètics.

En la resistència a insulina, per tant, hi ha una component d'inflamació sub-clínica.

### **Resistència a insulina al múscul**

El múscul és responsable de la captació de fins al 75% de la glucosa circulant en estat postabsortiu. En estats de resistència a insulina, la captació de glucosa post-pandrial per part del múscul esquelètic es veu compromesa, ja que el transport (mediat pel transportador de glucosa Glut4) i fosforilació de glucosa al múscul (reacció catalitzada per la hexoquinasa, HK) són mecanismes depenents d'insulina. La importància relativa de la senyalització de la insulina al múscul ha estat també valorada en models de ratolins knock out. Els ratolins genosuprimits per al receptor de la insulina al múscul (MIRKO, muscle insulin receptor knock out) no presenten alteracions en l'homeòstasi de la glucosa (9). En canvi, la seva deleció al múscul i teixit adipós provoca certa hiperinsulinèmia, resistència a insulina i intolerància a glucosa, però sense arribar a desenvolupar el fenotip diabètic (10). S'ha suggerit que efectes compensatoris en la captació de glucosa per part del teixit adipós (11) o un bypass de la senyalització de la insulina a través del receptor de IGF1 (insulin-like growth factor 1), amb el qual el receptor de la insulina comparteix gran homologia (12), podrien explicar l'absència de fenotip diabètic als ratolins MIRKO. Aquests resultats no posen en dubte la importància de la captació de glucosa postpandrial pel múscul en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa, sinó que fan palès el paper essencial del teixit adipós en la resistència a insulina. La resistència a insulina al múscul i teixit adipós precedeix l'inici de la diabetis oberta. Els mecanismes cel·lulars d'inducció de la resistència a insulina al múscul es descriuran més endavant.

### **Resistència a insulina al fetge**

La resistència a insulina al fetge té dues conseqüències: a) desregulació de la producció de glucosa hepàtica i, b) esteatosi hepàtica.

#### **Desregulació de la producció de glucosa hepàtica**

L'homeòstasi de la glucosa al fetge està regulada de forma coordinada per senyals hormonals, nutricionals i neuronals, tal i com es descriurà a l'apartat Regulació de l'homeòstasi energètica al

fetge. En la diabetis, aquest control es veu truncat, desembocant en una situació patològica. S'ha vist que els ratolins genosuprimits per al receptor de la insulina al fetge (LIRKO, liver insulin receptor knock out) pateixen una profunda resistència a la insulina a nivell perifèric i hepàtic (incapacitat de supressió de la producció de glucosa) i intolerància a la glucosa (13). Aquests estudis demostren la importància del fetge com a òrgan central en el control de l'homeòstasi de la glucosa.

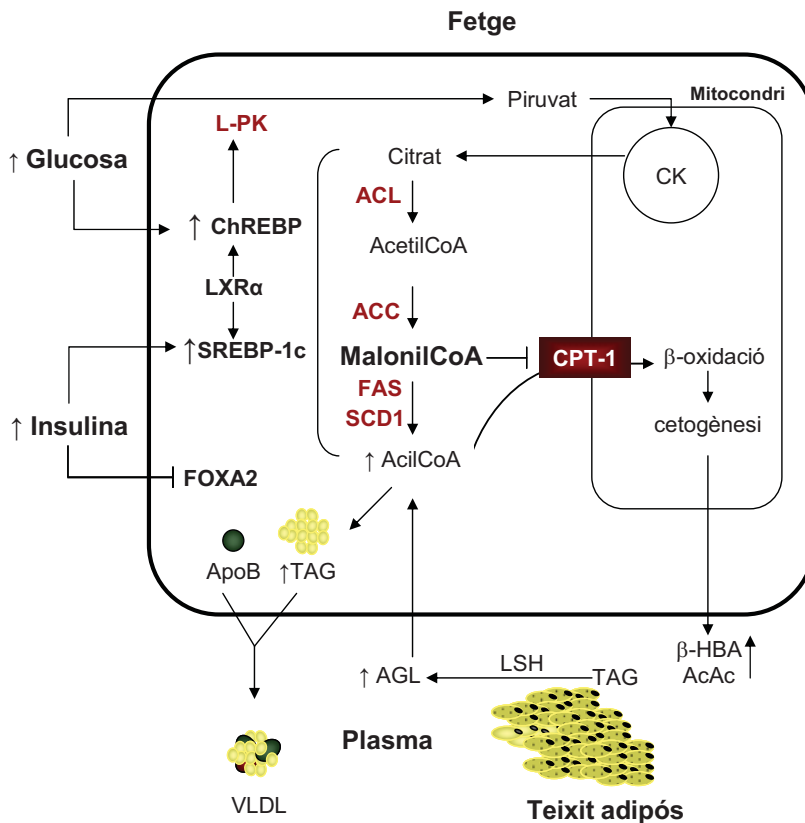
La captació d'àcids grassos pel fetge és un procés no regulat i, per tant, proporcional a la concentració en sang dels mateixos. L'increment de la taxa de lipòlisi i alliberació d'àcids grassos a la circulació, secundària a la resistència a insulina al teixit adipós, té conseqüències directes sobre el fetge: a) pèrdua de sensibilitat a la insulina (els mecanismes es descriuran més endavant) i b) increment de la taxa de producció de glucosa. S'han proposat mecanismes directes (independents de la regulació hormonal sobre la gluconeogènesi hepàtica) i indirectes (a través de la secreció i senyalització d'insulina):

1. La metabolització d'àcids grassos és una font de substrat (acetil-CoA), energia (ATP) i poder reductor (NADH) que pot activar directament la via gluconeogènica.
2. Els àcids grassos poden estimular la transcripció dels gens gluconeogènics (PGC-1 $\alpha$ , PEPCK-C i G6Pasa) a través de mecanismes moleculars que impliquen p38 MAPK (3).
3. La desensibilització del fetge a la insulina, impedeix el seu efecte regulador negatiu sobre la gluconeogènesi a través de la via de FOXO1 (Figura 3).

#### Lipidosi hepàtica

Els àcids grassos captats pel fetge són metabolitzats a través de: a) oxidació per a generar ATP o, b) esterificació per a generar triglicèrids. L'alteració d'una, o de les dues vies condueix, en el context d'un excès de lípids plasmàtics (dislipidèmia), a esteatosi hepàtica. En la patologia diabètica, tal i com s'il·lustra a la figura 1, una sèrie d'alteracions fisiològiques i moleculars conflueixen en l'acumulació de triglicèrids al fetge. La major disponibilitat d'àcids grassos incrementa la taxa de  $\beta$ -oxidació hepàtica, que es reflexa en un increment de cossos cetònics plasmàtics (acetoacetat; AcAc i  $\beta$ -hidroxibutirat;  $\beta$ -HBA). D'altra banda, al fetge, malgrat la incapacitat de la insulina per a suprimir-ne la gluconeogènesi (Figura 3) es manté la sensibilitat a insulina en la via lipogènica a través de SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein 1c). Tanmateix, FOXA2 (forkhead box A2; factor de transcripció que és bloquejat per insulina i està implicat en l'activació de gens del metabolisme lipídic i cetogènica) manté la seva sensibilitat a la insulina al fetge insulino-resistent, de manera que

els seus gens diana no s'activen al fetge diabètic, col·laborant a l'acumulació de lípids al fetge (14; 15). Aquest és un exemple del que s'anomena resistència a insulina selectiva (16).



**Figura 1. Alteracions metabòliques resultants en l'acumulació hepàtica de triglicèrids en estats de resistència a insulina.**

La síntesi de novo d'àcids grassos al fetge es regula de forma sinèrgica per insulina i glucosa a través dels factors de transcripció SREBP-1c i ChREBP (carbohydrate response element binding protein), que activen la transcripció de gens lipogènics (ACC, FAS) (17). A la vegada, la transcripció de ChREBP i SREBP-1c està regulada per LXR $\alpha$ , factor que s'activa per glucosa (18; 19). La hiperinsulinèmia, fins i tot en estats de resistència a insulina, activa la transcripció de SREBP-1c. Addicionalment, conseqüència de la hiperglucèmia, i de forma secundària a la metabolització de glucosa, ChREBP s'activa per fosforilació. Conseqüentment, hi ha un increment de la via lipogènica i de la concentració de malonil-CoA, inhibidor alostèric de la CPT-1 (carnitina palmitoil transferasa-1), pas limitant de la  $\beta$ -oxidació mitocondrial d'àcids grassos. Per tant, en una situació d'hiperglucèmia i

resistència a insulina, els àcids grassos de la circulació captats pel fetge seran preferentment esterificats i acumulats en forma de triglicèrids, contribuint a la hipertriglicèridèmia associada a la patologia. L'excés de triglicèrids són secretats en forma de VLDL (very low density lipoprotein), incrementant els triglicèrids en plasma (Figura 1). Tanmateix, la inhibició que exerceix el malonilCoA sobre la CPT1 pot ser sobrepassada per nivells intracel·lulars d'acilCoA per sobre d'un llindar (20), de manera que en una situació de diabetis oberta estan incrementades tant la síntesi de novo i l'esterificació d'àcids grassos, com la seva oxidació, encara que l'acció de la insulina sobre FOXA2 limiti, en cert grau, la capacitat oxidativa hepàtica. Tot plegat, la sobreproducció simultània de glucosa i àcids grassos al fetge estimula encara més la síntesi d'insulina al pàncreas, i la resistència a insulina a teixits perifèrics.

### **Mecanismes cel·lulars d'inducció de resistència a insulina per lípids**

Tot i que els factors primaris desencadenants de la patologia es desconeixen, hi ha una correlació entre els nivells circulants d'àcids grassos i el desenvolupament de resistència a insulina. Dos possibles mecanismes d'inducció de resistència a insulina pels àcids grassos circulants són: a) el cicle de la glucosa-àcids grassos i b) la inhibició del receptor de la insulina (IRS) per fosforilació en residus de serina.

#### **Cicle de la glucosa-àcids grassos**

Els nivells incrementats d'àcids grassos lliures (AGL) i triglicèrids en sang repercuteixen en la reducció de la captació i oxidació de glucosa en resposta a insulina a múscul. Randle i col·laboradors (21) postularen el 1963 un mecanisme pel qual la glucosa i els àcids grassos competeixen per la seva utilització en cèl·lules musculars, que s'anomenà cicle de la glucosa-àcids grassos (Figura 2). In vivo, aquest cicle podria oferir una explicació a la menor captació de glucosa al múscul en una situació de resistència a insulina, quan els nivells i d'àcids grassos circulants estan incrementats. Segons Randle, en presència d'àcids grassos, aquests són oxidats en detriment de la captació i oxidació de glucosa. L'oxidació d'àcids grassos comportaria l'increment de la concentració intramitocondrial d'acetil-CoA, citrat i NADH, que mediarien els efectes inhibitoris sobre el catabolisme de la glucosa. En primer lloc, l'increment d'acetil-CoA i NADH intramitocondrial medarien la inhibició del complex piruvat deshidrogenasa (PDH). L'increment de citrat bloquejaria la fosfofructoquinasa-1 (PFK1), que resultaria en un increment intracel·lular de gluosa-6-fosfat, la



inhibició per producte de la hexoquinasa (HK) i el bloqueig de la captació i oxidació de glucosa. No obstant, estudis en humans suggereixen l'existència d'altres mecanismes per a explicar la reducció de l'oxidació de glucosa en resposta a nivells incrementats d'àcids grassos.

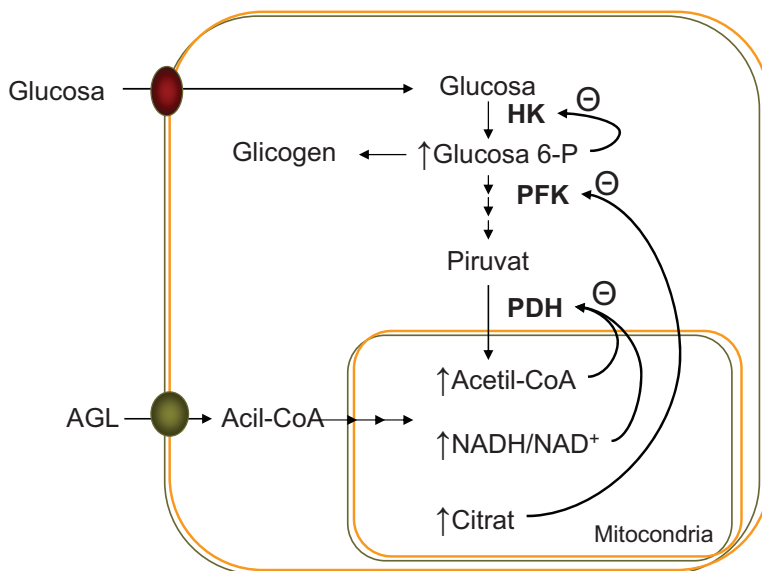


Figura 2. Cicle de la glucosa-àcids grassos al múscul.

### Inhibició d'IRS per fosforilació en residus de serina

L'increment d'àcids grassos circulants i de la seva captació desemboca en una deposició intracel·lular de lípids als teixits sensibles a insulina (múscul i fetge), comportant una lipotoxicitat. Estudis realitzats per Shulmann i col·laboradors (22) han suscitat la proposta d'un segon mecanisme de resistència a insulina, mediat pels àcids grassos i/o espècies lipídiques derivades de la metabolització intracel·lular d'aquests, que implica el bloqueig de la senyalització de la insulina a nivell del IRS. Aquestes espècies lipídiques poden induir l'activació de determinades isoformes de la protein quinasa C (PKC), tant al múscul com al fetge, que fosforilen IRS en residus de serina. En aquestes circumstàncies, la via de senyalització de la insulina, que s'inicia per reaccions de fosforilació en residus de tirosina, es veuria bloquejada (Figura 3). El bloqueig de la transducció de la senyal d'insulina al múscul comporta el bloqueig del transport de glucosa i de la síntesi de glicogen.

Al fetge, incapacita la inhibició de la gluconeogènesi hepàtica i la síntesi de glicogen en alimentació. Ambues conseqüències contribueixen significativament a la hiperglucèmia diabètica.

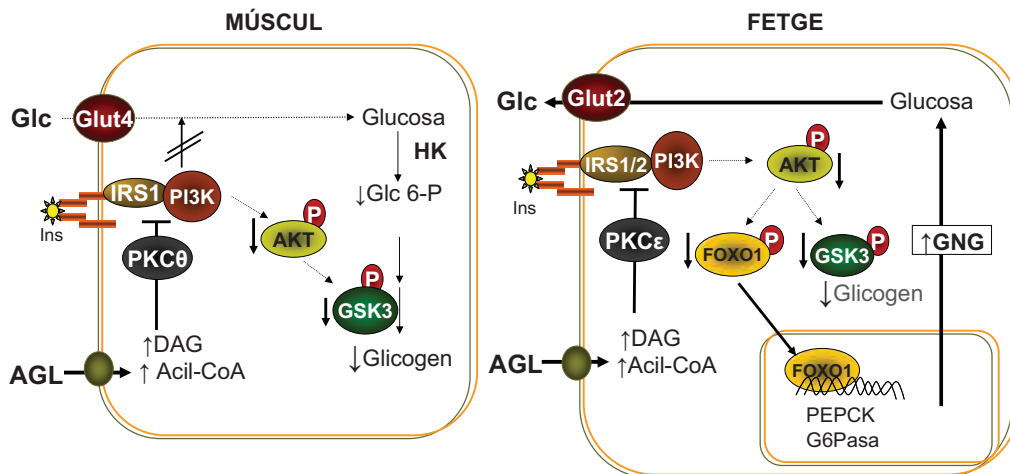


Figura 3. Interacció de les espècies lipídiques amb la senyalització d'insulina.

Una qüestió important que és objecte d'intens estudi és la naturalesa de les espècies lipídiques responsables de la inducció de resistència a insulina per aquest mecanisme. Tot i que l'acumulació intracel·lular de triglicèrids (TAG) n'és un factor associat, tant a fetge com a múscul, els triglicèrids són considerats "inherents" en la inducció d'aquesta via, a diferència d'altres espècies lipídiques com els acil-CoA, diacilglicerol (DAG) o les ceramides, que sí s'han associat a la inducció d'aquesta via en diferents estudis. Al múscul, s'ha vist un increment de l'activitat PKCθ en resposta al DAG (23). Al fetge PKCε sembla ser la isoforma medidora de la inducció de resistència a insulina per espècies lipídiques (24), presumiblement DAG, en detriment dels TAG i acil-CoA (25; 26).

Alternativament, l'acumulació d'acilCoA intracel·lulars podria venir donada per una reducció de la β-oxidació mitocondrial, deguda a una disfunció mitocondrial o una pèrdua de mitocondris. Recentment s'ha proposat que l'origen d'espècies lipotòxiques estaria en una oxidació mitocondrial incompleta degut a que la taxa de β-oxidació excedeix el flux a través del cicle de Krebs i la cadena de transport d'electrons, conduint a l'acumulació intramitocondrial de metabòlits, estrès oxidatiu i resistència a insulina a través de senyals no descrites fins al moment (27). Per tant, en base a aquestes hipòtesis, una alternativa terapèutica es basaria en incrementar la capacitat del cicle de Krebs.

## **Malonil-CoA i AMPK, un duet regulador del metabolisme energètic: implicacions en la resistència a insulina**

### **Malonil-CoA**

Dennis Mc Garry i Danny Foster (28) descriviren el 1977 el mecanisme a través del qual, en presència d'insulina i glucosa, l'oxidació d'àcids grassos és inhibida per malonil-CoA, tant al múscul com al fetge (29). El malonil-CoA és, a la vegada, substrat de la síntesi d'àcids grassos i inhibidor al·lostèric de la carnitina palmitoil transferasa (CPT-1), enzim limitant de la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos (Figura 1). Quan els nivells de malonil-CoA incrementen, la captació i oxidació mitocondrial d'àcids grassos es suprimeixen (per l'acció inhibidora del malonil-CoA sobre la CPT-1) i el pool de malonil-CoA es deriva cap a la síntesi d'àcids grassos i la seva posterior esterificació. Així, l'acumulació de malonil-CoA estaria lligada a la resistència a insulina i al redireccionament del metabolisme cap a la síntesi de novo i esterificació d'àcids grassos. Per tant, la inhibició d'ACC i l'increment de la capacitat oxidativa d'àcids grassos s'ha associat amb la millora de la sensibilitat a insulina (30; 31).

### **La quinasa dependent d'AMP (AMPK)**

La quinasa dependent d'AMP (AMPK) és una serina/treonina kinasa heterotrimèrica composta per una subunitat  $\alpha$  catalítica i unes subunitats  $\beta$  i  $\gamma$  reguladores. Increments en la relació AMP:ATP intracel·lular fan la AMPK susceptible a les quinases LKB1 i proteïn-quinasa dependent de calmodulina alfa (CaMKK $\alpha$ ), que fosforilen AMPK en residus de Thr172 i l'activen. AMPK actua com a sensor de l'estat energètic cel·lular: de forma general, s'activa en situacions d'estrès metabòlic en les que s'inhibeix la producció d'ATP (com hipòxia o hipoglucèmia) o n'hi ha un elevat consum (com durant la contracció muscular) i actua activant les vies de catabòliques (com l'oxidació d'àcids grassos) i inactivant les anabòliques (com la síntesi proteica, glicogenogènesi, lipogènesi, colesterogènesi i gluconeogènesi). AMPK exerceix el seu control metabòlic amb efectes a curt termini, fosforilant i modulant l'activitat d'enzims (ACC, HMGCoA reductasa, glicogen sintasa, PFK2, i altres) i amb efectes a llarg termini, regulant l'expressió gènica a través de la fosforilació de factors de transcripció (entre els que s'inclouen TORC2, HNF4- $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , ChREBP i SREBP-1c) (32). A les cèl·lules musculars, l'activació d'AMPK (per exemple, durant la contracció muscular) promou la captació i oxidació de glucosa a través de Glut4, l'oxidació d'àcids grassos i la biosíntesi mitocondrial. Al fetge,

l'activació d'AMPK activa vies de producció d'ATP ( $\beta$ -oxidació) i inhibeix aquelles que en consumeixen (gluconeogènesi, lipogènesi).

En situacions d'elevades concentracions d'àcids grassos plasmàtics, la captació i activació dels àcids grassos a acil-CoA intracel·lulars provoca un increment de la relació AMP:ATP, que té com a conseqüència l'activació d'AMPK i proporciona un mecanisme pel qual els àcids grassos suprimeixen l'oxidació de glucosa: AMPK fosforila i inhibeix ACC, disminuint el contingut intracel·lular de malonil-CoA. Així, afavoreix el transport mediat per CPT-1 i la subseqüent oxidació mitocondrial dels acil-CoA (Figura 1). Addicionalment, AMPK podria exercir un efecte protector sobre l'esteatosi a través de la regulació de factors de transcripció com SREBP-1c i ChREBP que, de forma indirecta, resulta en la supressió dels enzims lipogènics ACC i FAS (33; 34). Aquestes accions d'AMPK, prevenen l'esteatosi i contrarresten la resistència a insulina tant a al fetge com al múscul (Figura 4).

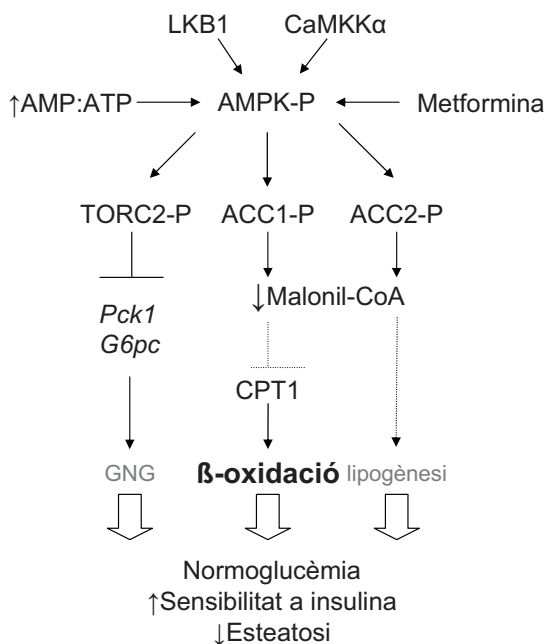


Figura 4. Efectes de l'activació d'AMPK en un fetge diabètic

L'activació d'AMPK podria, doncs, ser una fita farmacològica per a una aproximació terapèutica per la diabetis (35; 36). De fet, algunes de les teràpies actualment utilitzades per a la diabetis tipus II

(metformina, restricció calòrica i exercici) activen AMPK a fetge i múscul i en redueixen la concentració intracel·lular de malonil-CoA.

## Dianes terapèutiques i fàrmacs antidiabètics

La teràpia substitutòria d'insulina, actualment la única a l'abast dels pacients amb diabetis tipus I, pot arribar a controlar de forma global la hiperglucèmia i retardar l'aparició de les complicacions secundàries associades. No obstant, no resulta sempre satisfactòria degut a l'estricta règim i continu control al qual els pacients han de sotmetre's per tal d'assegurar l'euglucèmia. El principal problema que aquesta teràpia presenta és la manca de regulació fisiològica de l'alliberació de la insulina injectada, desembocant en freqüents hipoglucèmies i donant lloc a una morbiditat significativa i, fins i tot, mortalitat. Per tant, el control efectiu i permanent de la glucèmia en aquests pacients requereix del desenvolupament d'un sistema endogen de producció d'insulina, regulat fisiològicament, que aconsegeixi un control estricte de la glucèmia.

Per al tractament de la diabetis tipus II existeixen diversos fàrmacs que actuen sobre els òrgans implicats, en major o menor mesura, en la resistència a insulina i la hiperglucèmia característiques de la malaltia (37) (Figura 5).

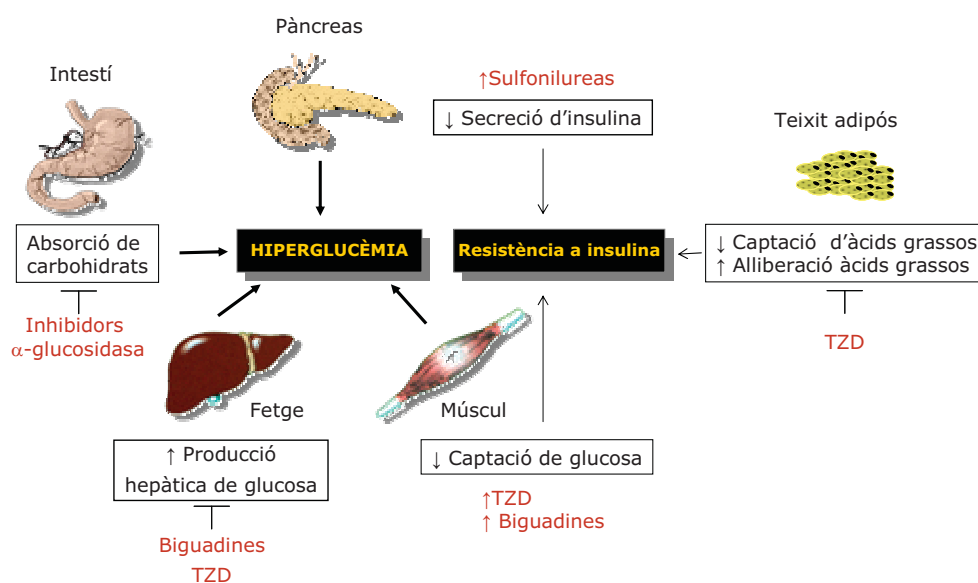


Figura 5. Òrgans i diana dels fàrmacs hipoglicèmics orals.

Les **sulfonilureas** van ser els primers fàrmacs antidiabètics del mercat. Actuen sobre el receptor de sulfonilureas de les cèl·lules  $\beta$ , promovent la secreció d'insulina. Aquest increment d'insulina en sang és suficient per a compensar la resistència dels teixits perifèrics a la hormona, incrementant la captació de glucosa pel múscul i reduint la PHG (38). Malauradament, en la majoria dels casos la pèrdua progressiva de l'eficàcia del control de la glucèmia, possiblement degut al defalliment de les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques (39), fa necessari recórrer a la complementació de la teràpia amb insulina. Els efectes adversos del fàrmac inclouen possibles episodis d'hipogluèmia i increment de pes.

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

Les **tiazolidinediones** (TZD), entre les quals trobem la **rosiglitazona** i la **pioglitazona**, actuen com a lligands selectius del receptor nuclear PPAR- $\gamma$ , expressat principalment al teixit adipós i implicat en el control de l'adipogènesi (40). PPAR- $\gamma$  està implicat en el control de la transcripció de PEPCK-C i glicerol quinasa, incrementant la gliceroneogènesi i la reesterificació d'àcids grassos al teixit adipós i reduint-ne l'alliberació a sang (41; 42). Així, l'activació de PPAR- $\gamma$  al teixit adipós incrementa la capacitat de redirigir l'excés de greixos de la circulació, disminuint la concentració d'àcids grassos lliures en sang, amb la conseqüent sensibilització a insulina als teixits perifèrics i la reducció de gluconeogènesi en fetge (43; 44). Els efectes deleteris directes inclouen un increment dels nivells de colesterol LDL i una idiosincràtica hepatotoxicitat associada amb la primera forma comercial (troglitazona), ja retirada del mercat (45-47).

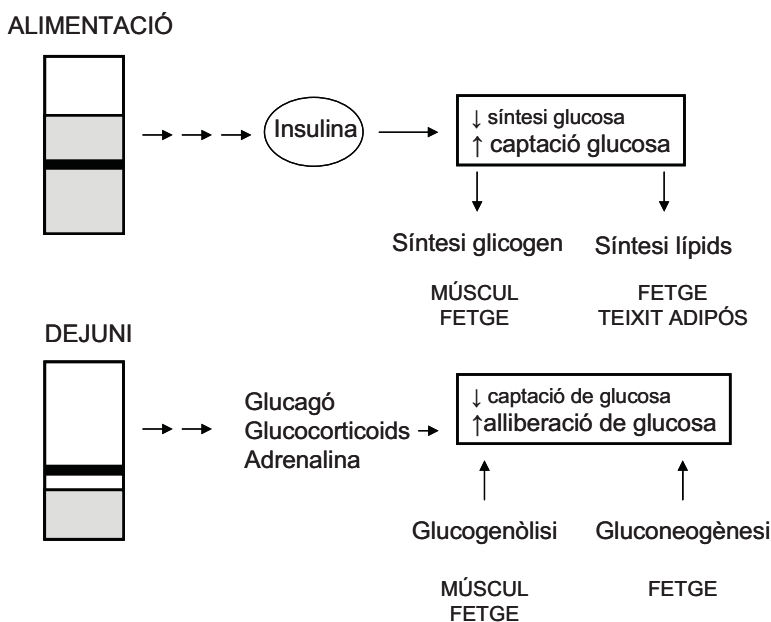
La **metformina** és la biguadina que constitueix el fàrmac de primera elecció per als malalts de diabetis tipus II. El seu mecanisme molecular és actualment objecte d'intens estudi. La seva diana molecular és el complex I de la cadena de transport d'electrons, el qual bloqueja, cosa que comporta una baixada dels nivells intracel·lulars d'ATP (48). Aquesta és una senyal activadora del sensor metabòlic i energètic cel·lular AMPK, mediador dels efectes de metformina (49; 50). Després de l'administració oral de metformina, l'activació d'AMPK al fetge, principal òrgan diana, activa vies de producció d'ATP (captació i utilització de glucosa, i  $\beta$ -oxidació) i inhibeix aquelles que en

consumeixen (gluconeogènesi, lipogènesi) (Figura 4). L'administració oral de metformina, en menor mesura, també activa la captació i utilització de glucosa pel múscul (51-54). Entre els efectes adversos, el més freqüent és la diarrea, que afecta en un 30% de forma dosi-depenent; el més greu, tot i que molt poc freqüent és l'acidosi làctica (54; 55).

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

## REGULACIÓ DE L'HOMEÒSTASI ENERGÈTICA AL FETGE

La necessitat de mantenir els nivells de glucèmia dins un estret rang fisiològic (entre 4 i 7 mM) respon a la dependència quasi absoluta del cervell per la glucosa com a substrat energètic i als efectes deleteris de la glucosilació de proteïnes resultants de nivells de glucosa sostingudament elevats. És, per tant, necessari un sofisticat sistema per a mantenir l'homeòstasi de la glucosa independentment de l'estat nutricional. Per aconseguir tal fita l'organisme disposa d'un sistema de senyalització hormonal i nutricional al sistema nerviós central, pàncreas (insulina i glucagó) i teixit adipós (àcids grassos i adipoquines) que actua tant sobre el fetge com sobre el múscul i el teixit adipós.



**Figura 6. Sistema de manteniment de la glucèmia en rangs fisiològics independentment de l'estat nutricional.**

La insulina és la principal hormona moduladora de l'homeòstasi de la glucosa. En situacions d'alimentació, en que l'aport de glucosa és molt important, la insulina senyalitza sobre els teixits que en són sensibles per a permetre l'absorció de glucosa i la seva acumulació als reservoris, en forma de glicogen al múscul i al fetge (glicogènesi), o d'àcids grassos al teixit adipós i al fetge (lipogènesi). En situacions de dejuni, en que no hi ha aportació de glucosa de la dieta, la senyalització a través d'hormones com el glucagó aconsegueix mantenir els nivells de glucosa circulant gràcies a l'alliberació de glucosa dels reservoris anteriorment citats (glicogenòlisi) i a l'estimulació de la síntesi



de novo de glucosa (gluconeogènesi) (Figura 6). La disrupció d'aquest sistema de control de l'homeòstasi de la glucosa per manca d'insulina o de la seva via de senyalització esdevenen en la patogènia diabètica descrita a l'apartat anterior.

### **Acció de la insulina sobre el fetge per al manteniment de l'homeòstasi de la glucosa**

L'habilitat del fetge per a produir glucosa és essencial per a la supervivència en estats de dejuni. El balanç insulina/glucagó és el principal regulador de la producció hepàtica de glucosa (PHG), quedant en un segon pla l'adrenalina i els glucocorticoids, que tenen importància en situacions d'estrès (Figura 6). La insulina regula el metabolisme hepàtic a través de mecanismes directes (que impliquen la transducció de la via de senyalització de la hormona al fetge) i indirectes (que són independents de la senyalització de la hormona al fetge) .

#### **Mecanismes directes de la insulina sobre el metabolisme hepàtic**

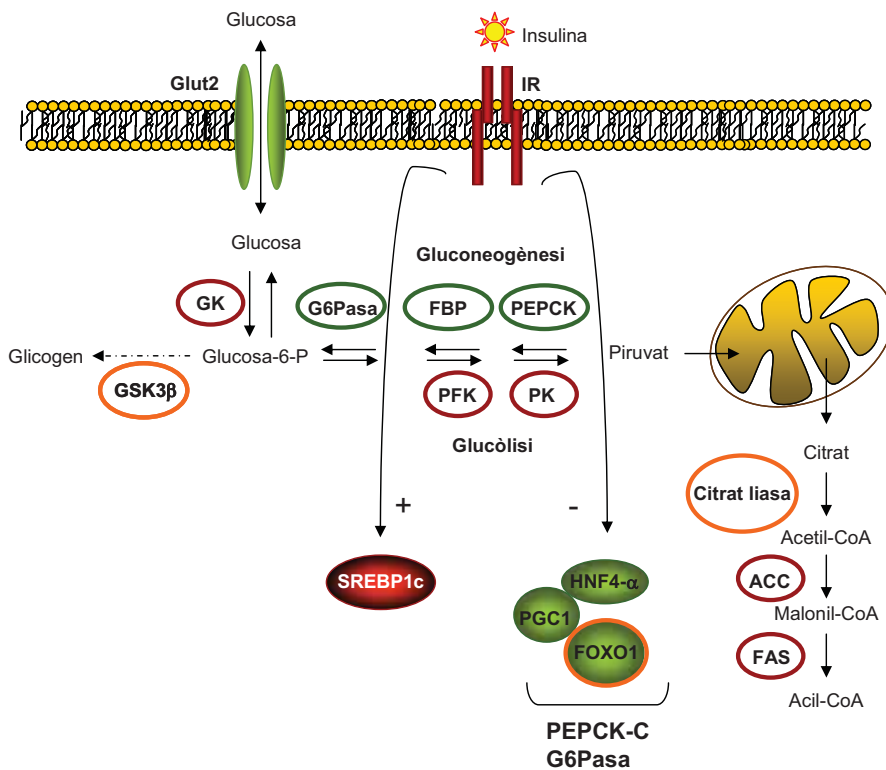
Els mecanismes directes pels quals la insulina regula al fetge la utilització i emmagatzematge de glucosa en forma de lípids i glicogen i la producció de glucosa de novo comprenen tant efectes immediats, com a llarg termini. Els **efectes immediats** impliquen la modulació de l'activitat d'enzims mitjançant modificacions post-transcripcionals com, per exemple, la inhibició de la glicogenòlisi per fosforilació de la GSK3 $\beta$ . Els **efectes a llarg termini** impliquen la regulació de l'expressió d'enzims i factors de transcripció. Aquests efectes són, principalment, la regulació negativa de la transcripció la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa citosòlica (PEPCK-C) i la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), i l'increment de la transcripció de factors de transcripció, com SREBP-1c que regulen la transcripció de gens glucolítics, com la glucoquinasa (GK) i lipogènics, com la sintasa d'àcids grassos (FAS) i l'acil-CoA carboxilasa (ACC) (Figura 7).

#### **Mecanismes indirectes de la insulina sobre el metabolisme hepàtic**

Els mecanismes indirectes de la insulina sobre la regulació de la producció hepàtica de glucosa inclouen:

- a) Supressió de la lipòlisi al teixit adipós, limitant l'activació de la gluconeogènesi induïda per àcids grassos.
- b) Inhibició de la secreció de glucagó.

c) Activació de les vies hipotalàmiques de control de l'homeòstasi de la glucosa.



**Figura 7. Regulació directa de la insulina sobre la PHG.** La insulina activa coordinadament enzims i factors de transcripció glucolítics i lipogènics (encerclats en vermell) i inhibeix l'expressió de gens gluconeogènics (encerclats en verd). Encerclats en taronja, els enzims inhibits per la insulina de forma directa per fosforilació.

Hi ha una gran controvèrsia sobre la rellevància dels efectes directes versus els efectes indirectes de la insulina sobre la producció hepàtica de glucosa (PHG). L'ús de models de ratolins genèticament modificats en els quals el receptor de la insulina ha estat deletat de forma específica al fetge (LIRKO, liver insulin receptor knock out) ha ajudat a conèixer millor els mecanismes de regulació de la PHG per la insulina. Els ratolins LIRKO perden la capacitat de la insulina per a suprimir la PHG i desenvolupen resistència a insulina i diabetis (13), suggerint la primacia de la senyalització directa de la insulina sobre fetge en el control de la PHG a llarg termini. No obstant, estudis més recents han demostrat que la depleció aguda del receptor d'insulina al fetge mitjançant oligonucleòtids antisentit no compromet la capacitat de la insulina per a suprimir la PHG (56), apuntant cap a l'existència de mecanismes indirectes d'actuació de la insulina a teixits extrahepàtics que contribueixen al control de la PHG a curt termini. Addicionalment, la restitució de la senyalització hepàtica d'insulina als animals

knock out per al receptor d'insulina no és suficient per a restituir el control de la insulina sobre la producció hepàtica de glucosa i prevenir eficientment el desenvolupament de diabetis (57), és a dir, que aquests fetges continuen presentant resistència a la insulina tot i preservar la via de senyalització de la hormona. En conjunt, aquests estudis suggereixen que per a mediar els efectes crònics de la insulina sobre la PHG es requereix la trasducció de la senyal de la hormona al propi fetge, però que aquesta senyalització no és suficient per a mediar els efectes aguts de la insulina sobre la PHG.

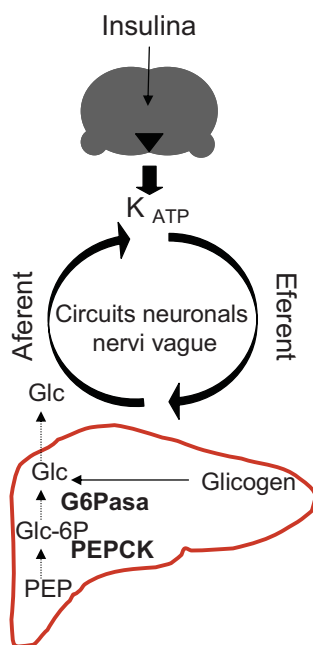


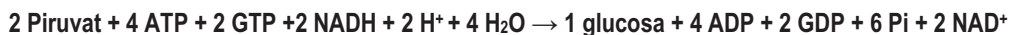
Figura 8. Esquema del circuit neuronal entre el fetge i el sistema nerviós central a través del nervi vague. ▼ hipotàlam.

En aquest sentit, recentment, Rossetti i col·laboradors han fet palesa l'existència de circuits neuronals que regulen de forma indirecta la producció hepàtica de glucosa a través del nervi vague. Aquests circuits actuarien com a sensors centrals de l'estat nutricional (58; 59). Senyals nutricionals (p.ex. nivell d'oxidació lipídica) i/o la senyalització d'insulina a les neurones hipotalàmiques activarien canals de potassi dependents d'ATP, senyal que, conduïda a través de les vies eferents del nervi vague cap al fetge, desemboca en la supressió de la gluconeogènesi hepàtica (60) per mecanismes moleculars desconeguts (Figura 8). Adicionalment, altres grups han descrit la intercomunicació entre el fetge i els òrgans perifèrics (p.ex. teixit adipós), a través de les vies aferents del nervi vague

(61; 62). Aquests resultats suggereixen l'existència d'un sistema centralitzat per al control de l'homeòstasi energètica, a través de la ramificació hepàtica del nervi vague, en el que el sistema nerviós central integra la informació rebuda dels teixits perifèrics en forma de senyals humorals i neuronals.

### **Gluconeogènesi hepàtica**

Dos fluxos metabòlics determinen la producció hepàtica de glucosa neta: d'una banda la gluconeogènesi i de l'altra la glicogenòlisi. La gluconeogènesi és la formació de glucosa a partir de piruvat amb la següent estequiometria:



La generació de piruvat o lactat a partir de glucosa es duu a terme a través de la via glucolítica. En el sentit contrari, la producció de glucosa lliure a partir d'àcids tricarboxílics (com piruvat o lactat) s'anomena gluconeogènesi. La síntesi de glicogen (glicogenogènesi) es pot aconseguir per dues vies: a partir de glucosa lliure (via directa), o a partir d'àcids tricarboxílics (via indirecta). La degradació del glicogen per a obtenir glucosa s'anomena glicogenòlisi (Figura 9).

Donat que la via gluconeogènica (piruvat  $\rightarrow$  glucosa) és el camí invers de la glucòlisi (glucosa  $\rightarrow$  piruvat), les reaccions bidireccionals de la via en són comunes. Només aquelles reaccions unidireccionals i irreversibles són catalitzades per enzims diferents en ambdues vies. Quatre són els enzims exclusivament gluconeogènics: piruvat carboxilasa (PC), fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK); fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBP) i glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). Aquests enzims formen part de tres cicles de substrats o cicles fútils, conjuntament amb els enzims de la via glucolítica que catalitzen la reacció inversa. Aquests cicles fútils consumeixen ATP, sense generar cap producte, i permeten una fina regulació del flux de la via cap a una o altra direcció. El primer cicle el conformen la PK, la PC i la PEPCK, el segon la PFK i la FBP i el tercer la G6Pasa i la GK (Figura 9). Els gens gluconeogènics són regulats exclusivament a nivell transcripcional, amb l'excepció de la FBP, que és inhibida al·lostèricament per la fructosa-2,6-bisfosfat i la PC, que és activada al·lostèricament per acetil-CoA.

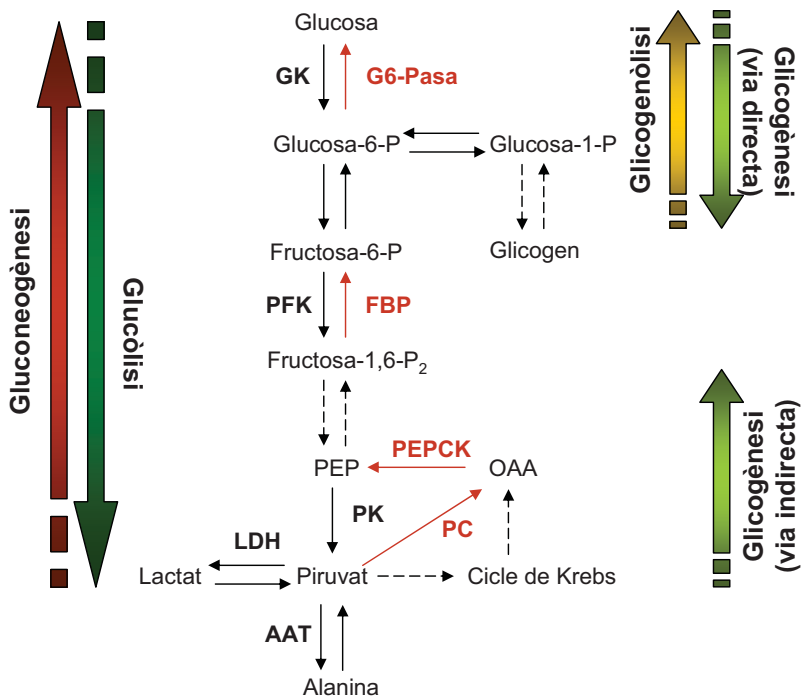


Figura 9. Principals fluxos de glucosa al fetge.

### Substrats gluconeogènics

Quantitativament, el piruvat no és el substrat més abundant de la via gluconeogènica. Altres substrats gluconeogènics d'origen extrahepàtic, com el lactat (substrat més abundant) o l'alanina, poden ser convertits a piruvat al fetge com a pas previ a la via gluconeogènica. El lactat produït en la glucòlisi anaeròbica de teixits perifèrics, com el múscul o els eritròcits, és convertit a piruvat per acció de la lactat deshidrogenasa (LDH) (Cicle de Cori). L'alanina, provinent de proteòlisi muscular, és desaminada per l'alanina aminotransferasa (AAT) a piruvat, transferint el residu amina del glutamat (Glu) al  $\alpha$ -cetoglutarat ( $\alpha$ -KG). Altres aminoàcids (com la glutamina), poden incorporar-se, prèvia desaminació, al cicle de Krebs, per a ser convertits OAA i entrar a la via gluconeogènica. El glicerol alliberat per la lipòlisi de teixit adipós és fosforilat a glicerol-3-fosfat per la glicerol quinasa (Gli-K), entrant en la via gluconeogènica sense passar per piruvat (Figura 10).

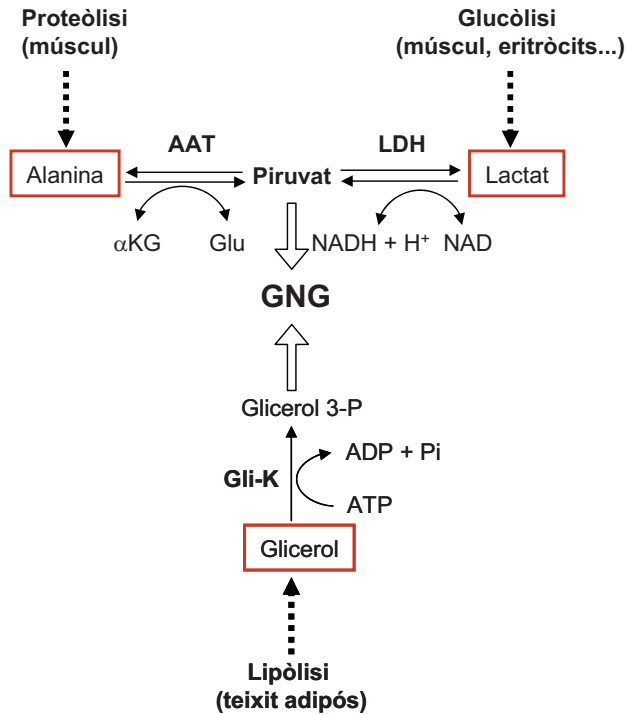
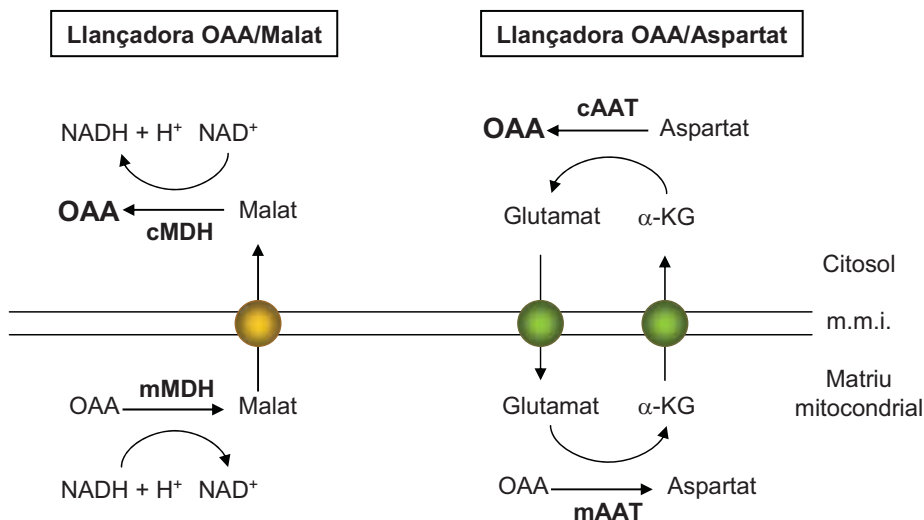


Figura 10. Substrats gluconeogènics del fetge.

### Localització intracel·lular de les reaccions de la via gluconeogènica

Dins del fetge, les diferents reaccions de la gluconeogènesi es duen a terme en diferents compartiments subcel·lulars. L'obtenció de piruvat a partir dels diferents substrats gluconeogènics es duu a terme al citosol. Un cop al mitocondri, el piruvat és convertit a oxalacetat, ja sigui a través de la reacció catalitzada per la PC (reacció anapleròtica essencial per a reposar oxalacetat al cicle de Krebs), o a través del cicle de Krebs mateix. La conversió d'oxalacetat (OAA) a fosfoenolpiruvat, catalitzada per la PEPCK, es pot dur a terme al citosol (PEPCK-C) o a la matriu mitocondrial (PEPCK-M). La membrana mitocondrial és impermeable a l'oxalacetat, per tant, el transport de OAA mitocondrial cap al citoplasma es fa mitjançant llançadores d'àcids dicarboxílics, que impliquen malat o  $\alpha$ -cetoglutarat ( $\alpha$ -KG) (Figura 11). Quina de les dues llançadores és la font primària d'OAA citosòlic per a la gluconeogènesi depèn dels gradients de substrats entre citosol i mitocondri i del requeriment de poder reductor del citosol. En principi, el gradient de malat mitocondri-citoplasma n'afavoreix la sortida del mitocondri quan la conversió de malat a OAA al citosol és ràpida i el NADH

citoplasmàtic és oxidat a la via gluconeogènica. Si altres enzims, com la lactat deshidrogenasa (LDH), competeixen pel  $\text{NAD}^+$  citosòlic, el gradient de malat es perd i la llançadora d'oxalacetat-aspartat pren rellevància. Finalment, la desfosforilació de la glucosa prèvia a la sortida de la cèl·lula és una reacció que es dona al reticle endoplasmàtic, orgànul al que la G6Pasa es troba associada.

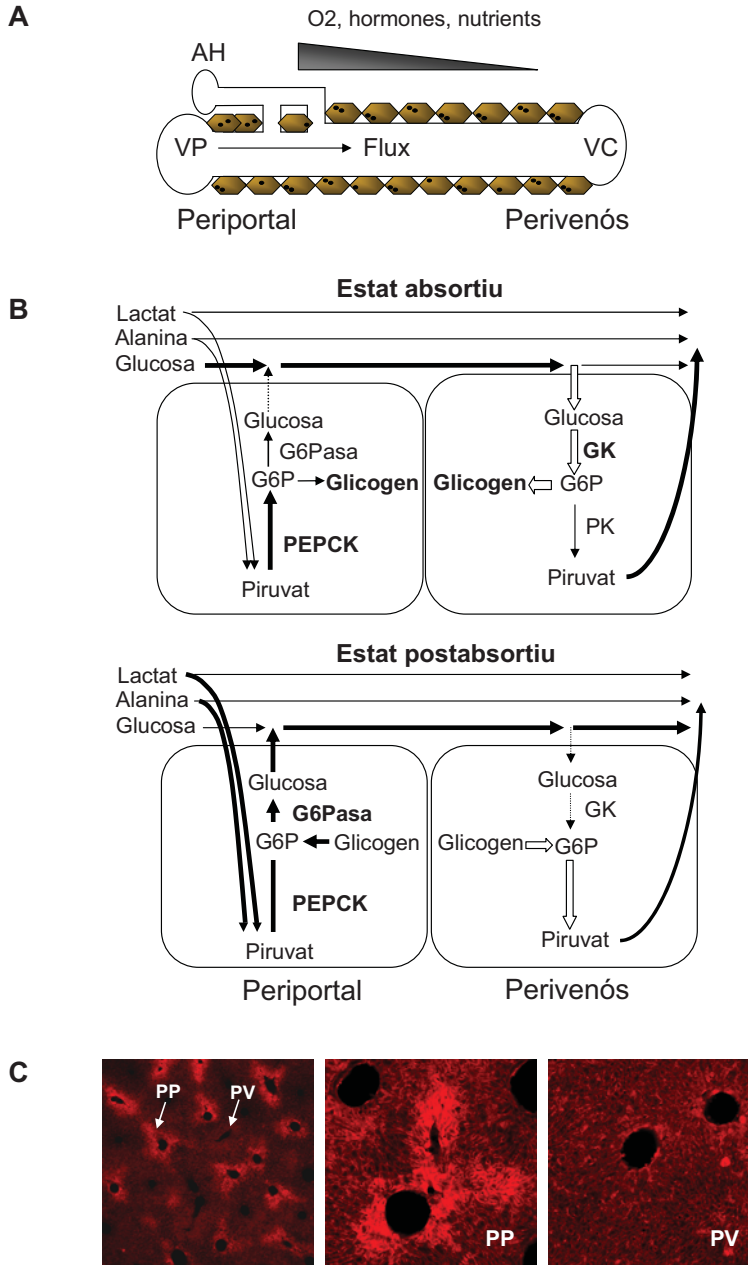


**Figura 11. Llançadores d'oxalacetat per a la formació de PEP citosòlic.** mMDH; malat deshidrogenasa mitocondrial, cMDH; malat deshidrogenasa citosòlica, mAAT; aspartat aminotransferasa mitocondrial, cAAT; aspartat aminotransferasa citosòlica, m.m.i.; membrana mitocondrial interna.

### Zonació metabòlica del fetge

El fetge és un òrgan heterogeni a nivell histoquímic. La sang rica en nutrients i oxigen entra a l'acinus hepàtic per la vena porta/artèria hepàtica i en surt per la vena hepàtica (Figura 12 A). La concentració de substrats i oxigen al llarg de l'eix periportal-perivenós determina un patró d'expressió gènica diferencial entre els hepatòcits periportals i els perivenosos, generant una zonació funcional i metabòlica dels hepatòcits dins de l'acinus hepàtic (63; 64). Segons aquest model, en estat absortiu, la glucosa és captada majoritàriament pels hepatòcits perivenosos, els qual sintetitzen glicogen per la via directa, mentre que els hepatòcits periportals serien els responsables de la síntesi de glicogen per la via indirecta a partir de substrats com alanina, lactat o glicerol provinents de la circulació. En estat postabsortiu, els hepatòcits periportals produïrien glucosa a partir dels reservoris de glicogen i de la gluconeogènesi indirecta (Figura 12 B). L'activitat gluconeogènica a l'acinus hepàtic es concentra, per

tant, a la zona periportal, coincidint amb el patró d'expressió de l'enzim fosfoenolpiruvat carboxiquinasa citosòlic (PEPCK-C), tal i com es mostra al panell inferior de la figura 12 C.

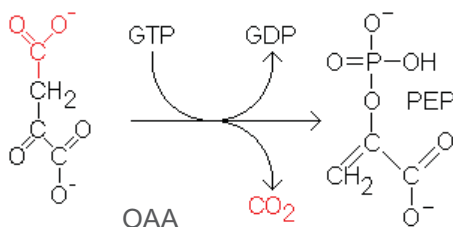


**Figura 12. Zonació hepàtica.** **A:** Esquema de l'eix porto-central. AH; artèria hepàtica, VC; vena cava, VP; vena porta. **B:** Esquema de la heterogeneïtat en el metabolisme de la glucosa entre els hepatòcits periportals i perivenosos. **C:** Detecció immunohistoquímica de PEPCK en talls de fetge. PP; periportal, PV; perivenós.



### Fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK)

La fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (E.C.4.1.1.32; PEPCK) catalitza la conversió d'oxalacetat a fosfoenolpiruvat de forma dependent de GTP (Figura 13). La reacció és reversible en condicions fisiològiques. S'ha proposat com el principal enzim regulador del flux de la via gluconeogènica (65).



**Figura 13. Reacció catalitzada per la PEPCK.** OAA; oxalacetat, PEP; fosfoenolpiruvat.

Existeixen dues isoformes de PEPCK, una de (PEPCK-C), aïllada per primer cop el 1963 a partir de fetge de rata (66), i una de mitocondrial (PEPCK-M), aïllada a partir de fetge de pollastre el 1953 (67). Ambdues isoformes estan codificades per diferents gens nuclears (Pck1 i Pck2 respectivament), però catalitzen la mateixa reacció; amb propietats cinètiques similars, però amb un patró d'expressió, regulació i localització subcel·lular diferent. Al fetge, l'inici de l'expressió de la PEPCK-C és perinatal, coincidint amb la iniciació de la capacitat gluconeogènica, fet essencial per al manteniment de la glucèmia en el període perinatal. En canvi, la PEPCK-M s'expressa al fetge ja abans del naixement. D'altra banda, la distribució intracel·lular de les isoformes de PEPCK al fetge és variable en funció de l'espècie (68) (Taula 1).

	PEPCK-C	PEPCK-M
	% activitat	
Humà	50	50
Cobaia	50	50
Gos	50	50
Gat	50	50
Rata	90	10
Ratolí	95	5
Conill	10	90
Pollastre	0	100

**Taula 1. Distribució intracel·lular de les isoformes de PEPCK en diferents espècies determinades en assajos d'activitat enzimàtica sobre la fracció citosòlica o mitocondrial de fetge.**

### **Regulació de l'activitat PEPCK-C**

La regulació dels gens Pck1 i Pck2 és completament diferent: mentre que Pck2 s'expressa de manera constitutiva, el gen Pck1 es regula a través de la modulació de la taxa de transcripció i de l'estabilitat de el mRNA. El mRNA de la PEPCK-C té una vida mitja de 30 minuts i la proteïna de 6 hores. Aquest ràpid reciclatge del mRNA, conjuntament amb la regulació a nivell de transcripció i estabilitat de el mRNA permeten una ràpida resposta en la modulació de l'activitat enzimàtica en front a l'estat nutricional i hormonal.

#### **Regió promotora del gen Pck1**

Nombrosos estudis han delimitat la regió promotora del gen Pck1 i han descrit els factors s'hi uneixen, dividint-la fonamentalment en quatre regions regulatòries (Figura 14).

**Regió 1:** conté una TATA box essencial per a la transcripció basal. També conté un element de resposta a cAMP (CRE) al que s'hi pot unir CREB (cAMP response element binding protein), mediador dels potents efectes transactivadors d'aquest segon missatger. A través d'aquest mateix lloc d'unió CRE, i competint per la seva unió amb CREB, exerceix el seu potent efecte inhibidor de la transcripció el factor ATF3 (activating transcription factor 3), possiblement, estabilitzant la unió del factor nuclear 1 (NF1) al seu lloc d'unió i potenciant-ne l'efecte negatiu sobre la transcripció del gen.

**Regió 2:** ha estat suggerida com a crítica en la regulació específica de teixit. Aquesta regió conté els elements d'unió a HNF-1 (hepatic nuclear factor 1), essencials per a la transcripció renal del gen, i el lloc P3(l), a través del qual els factors de transcripció C/EBP $\alpha$  i  $\beta$  en controlen la transcripció al fetge i al teixit adipós. En aquesta regió també s'ha descrit una zona d'unió a SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein 1), factor que exerceix un potent efecte negatiu (69).

**Regió 3:** consisteix en una unitat de resposta a glucocorticoids (GRU) i unes unitats de resposta a glucosa. També conté una regió AF1 a la qual es poden unir els factors HNF4- $\alpha$  (hepatic nuclear factor 4- $\alpha$ ), RXR (retinoic X receptor) i PPAR $\alpha$ - $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor). PGC-1 $\alpha$  (PPAR  $\gamma$  co-activator-1  $\alpha$ ) actua sobre aquesta regió del promotor coactivant HNF4- $\alpha$ . També s'hi ha descrit un possible lloc d'unió de SREBP-1c.

**Regió 4:** conté dos llocs d'unió de PPAR $\gamma$ -2 (PPARE), necessaris per a l'expressió específica a teixit adipós.

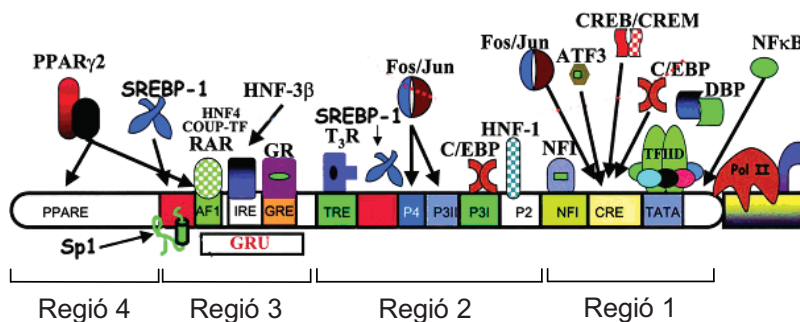


Figura 14. Regió promotora de Pck1. Adaptat de Chakravarty, K. (2004) Journal of Biological Chemistry.

### Regulació de l'expressió de PEPCK-C al fetge

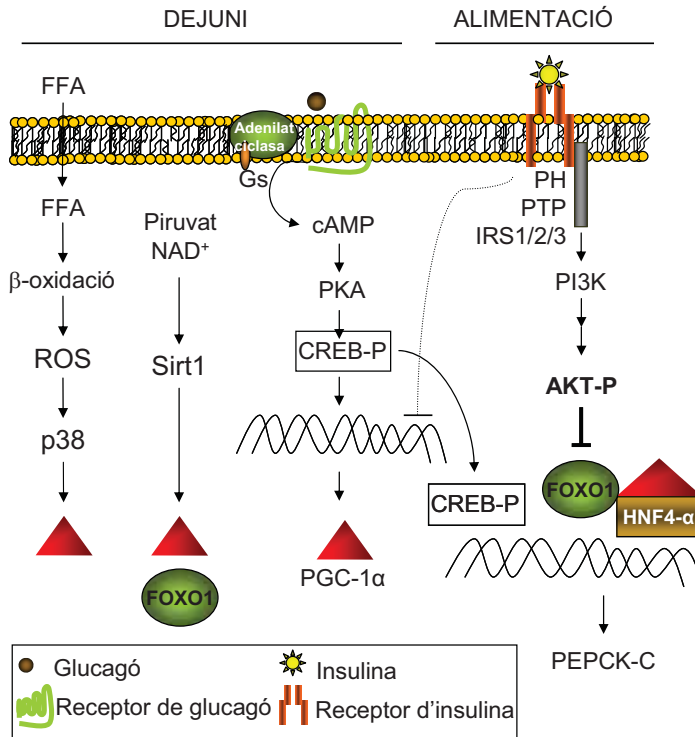
En la regulació transcripcional de Pck1 estan implicats factors hormonals i nutricionals (Figura 15). Les senyals hormonals i nutricionals que modulen l'expressió del gen Pck1 al fetge són:

#### Senyals hormonals

El principal eix regulador és la relació insulina:glucagó, però altres hormones, com els glucocorticoides i les hormones tiroides, en modulen els efectes (70). En dejuni, l'AMPc hepàtic (segon missatger i mediador dels efectes del glucagó) és responsable de l'estimulació de les vies que desemboquen en la transcripció del mRNA de PEPCK-C a través de PGC-1 $\alpha$  i CREB-Pi en la seva estabilització a través dels llocs d'instabilitat localitzats a la regió 3'UTR (71). PGC-1 $\alpha$  s'ha mostrat en els últims anys com a coactivador crític per a la transcripció de PEPCK-C i la regulació de la gluconeogènesi hepàtica, cetogènesi i  $\beta$ -oxidació. L'acció estimuladora de PGC-1 $\alpha$  sobre la gluconeogènesi hepàtica (no així sobre la  $\beta$ -oxidació ni cetogènesi) requereix la coactivació de HNF4- $\alpha$  (72). En dejuni i diabetis, els nivells de PGC-1 $\alpha$  estan incrementats i la coactivació de HNF4- $\alpha$  aconsegueix la plena activació transcripcional de PEPCK-C (73).

En alimentació, la via de senyalització d'insulina reprimeix la transcripció de PEPCK-C actuant sobre FOXO1 (Forkhead box O1). FOXO1 pertany a la família de factors de transcripció forkhead box, i s'expressa abundantment al fetge i a les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques. FOXO1 interacciona amb PGC-1 $\alpha$ , essent aquesta interacció necessària per a la transcripció dels gens gluconeogènics G6Pasa i PEPCK-C (74). En absència d'insulina, FOXO1 es troba directament unit als elements de resposta a insulina (IRE) (75). En resposta a insulina, la fosforilació de FOXO1 per AKT, comporta la seva

translocació al citoplasma, inactivació, ubiquitinització i degradació, amb la conseqüent pèrdua de l'activitat transcripcional (76; 77). Per tant, FOXO1 juga un paper essencial en la inhibició de la gluconeogènesi hepàtica en resposta a insulina i (75; 78; 79).



**Figura 15. Regulació transcripcional de Pck1 a fetge.** Senyalització hormonal de l'eix insulina-glucagó i senyalització nutricional mediada per Sirt1.

### Senyals nutricionals

En dejuni, una senyal nutricional mediada per NAD<sup>+</sup> activa la Sirt1, que deacetila PGC-1α, estimulant la interacció amb HNF4-α i activant la seva activitat transcripcional sobre els gens gluconeogènics (80). Sirt1 també deacetila FOXO1, retenint-lo al nucli i promovent la seva activitat transcripcional independentment de la senyalització d'insulina (81-83).

D'altra banda, en dejuni i diabetis, la lipòlisi al teixit adipós suposa un increment dels nivells plasmàtics d'àcids grassos, que són captats i β-oxidats al fetge, generant un exès de espècies reactives d'oxigen (ROS) que activen la p38 MAPK. S'ha vist que en resposta a àcids grassos

l'activació de p38 als hepatòcits indueix la fosforilació de CREB (3) i C/EBP $\alpha$  (84), incrementant la transcripció de PEPCK-C.

#### Regulació específica de teixit

L'expressió específica de teixit de Pck1 respon a l'existència d'elements reguladors al promotor, als que s'uneixen factors de transcripció específics de teixit (70). La regulació de Pck1 a teixits extrahepàtics no ha estat estudiada en profunditat, però en general respon als mateixos factors que al fetge, amb l'excepció de: a) el ronyó, on l'acidosi metabòlica (p.ex. durant l'exercici perllongat o diabetis) constitueix una senyal positiva (mediada per HNF-1) i l'alcalosi una de negativa (mediada per NF1), per la transcripció de PEPCK-C; i b) el teixit adipós, on els glucocorticoides (que actuen a través dels factors de transcripció de la família de C/EBP $\alpha$  i  $\beta$ ) reprimeixen la transcripció de PEPCK-C, al contrari del que passa al fetge. Aquesta discrepància serà comentada més extensament al subapartat Gliceroneogènesi. El factor de transcripció PPAR $\gamma$ -2, d'expressió quasi exclusiva en teixit adipós controla l'expressió de PEPCK-C en aquest teixit a través del lloc d'unió PPARE del promotor.

#### Funció fisiològica de PEPCK

La isoforma mitocondrial, PEPCK-M ha estat poc estudiada. Estudis de la dècada dels vuitanta en pollastre van confirmar la seva importància en la gluconeogènesi hepàtica i renal en aquesta espècie, tot i que la seva expressió és força ubíqua. S'ha proposat que la PEPCK-M podria exercir un paper important en la gluconeogènesi a partir de lactat, ja que la producció de PEP intramitocondrial obviaria la llançadora d'oxalacetat, mantenint els nivells de NADH citosòlic. Als teixits no gluconeogènics, amb una baixa activitat piruvat carboxilasa, com el múscul esquelètic, la capacitat de la PEPCK-M per a generar oxalacetat intramitocondrial pot ser essencial per al manteniment del flux del cicle de Krebs.

Pel que fa a la isoforma citosòlica (PEPCK-C), tot i ser considerada un enzim eminentment gluconeogènic, també s'ha detectat a teixits no gluconeogènics, com ara teixit adipós blanc i marró, múscul, cervell, intestí prim, pulmó, glàndula mamària, glàndules suprarenals i testicles (85), suggerint que, a més de participar en la gluconeogènesi, PEPCK-C pot tenir un paper essencial en altres processos metabòlics (Taula2).

Funció fisiològica	Teixit	Definició
Gluconeogènesi	Fetge Còrtex renal	Producció de novo de glucosa a partir de precursors no glucídics
Gliceroneogènesi	Fetge Teixit adipós blanc	Producció de novo de glicerol-3-P a partir de precursors no glucídics per a la reesterificació d'àcids grassos
Anaplerosi	Fetge Múscul esquelètic	Aport d'intermediaris del cicle de Krebs
Cataplerosi	Fetge Còrtex renal Intestí prim	Eliminació d'intermediaris del cicle de Krebs

**Taula 2. Paper fisiològic proposat per PEPCCK en diferents teixits.**

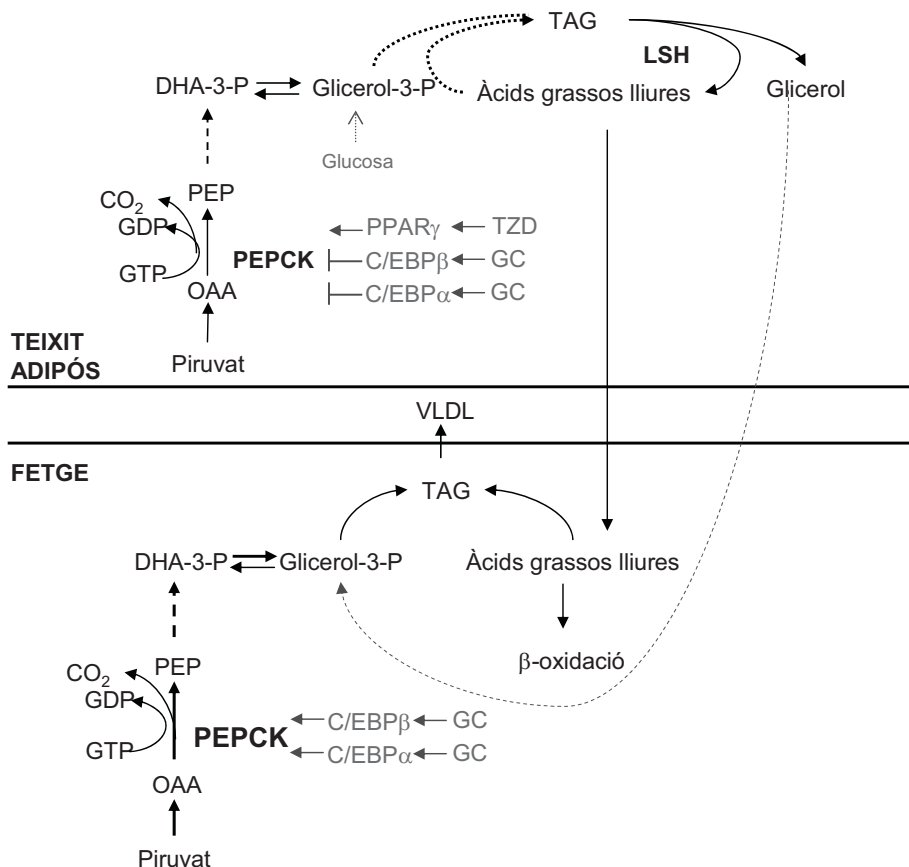
En els últims anys, estudis amb diferents models de knock-out i l'ús de tècniques de marcatge isotòpic, anàlisis bioquímic i ressonància magnètica nuclear han permès l'estudi del rol metabòlic que PEPCCK-C en els diferents teixits. Aquests estudis han posat de manifest la funció integradora de PEPCCK-C, no només en l'homeòstasi de la glucosa a través de la GNG hepàtica, sinó també en el metabolisme lipídic (gliceroneogènesi al fetge i al teixit adipós) i energètic (cataplerosi i anaplerosi). Seguidament es descriuen alguns d'aquests estudis, emfatitzant els aspectes més importants que fan referència a la funció fisiològica de la PEPCCK com a integrador de diferents vies metabòliques.

### Gliceroneogènesi

La gliceroneogènesi és una versió abreviada de la gluconeogènesi que proporciona glicerol-3-fosfat necessari per a la reesterificació d'àcids grassos lliures. La gliceroneogènesi és especialment important en estats de dejuni i afecta al metabolisme lipídic en sentit contrari al teixit adipós i al fetge (86). Al teixit adipós la gliceroneogènesi potencia la deposició d'una part dels àcids grassos lliures generats en la lipòlisi, esterificant-los en forma de triglicèrids. Al fetge, la gliceroneogènesi potencia tant la deposició intracel·lular de TAG com l'alliberació de VLDL a partir dels àcids grassos captats de la circulació. Aquest reciclatge d'àcids grassos entre el teixit adipós i el fetge forma part del cicle dels triglicèrids/àcids grassos, la funció fisiològica del qual està encara per determinar (Figura 16).

La deleció de l'element PPARE del promotor de PEPCCK-C en suprimeix l'expressió i la gliceroneogènesi al teixit adipós blanc, amb una incidència significativa de lipodistrofia (87). Contràriament, la sobreexpressió de PEPCCK-C al teixit adipós induïx obesitat (88) per l'acumulació de triglicèrids a teixit adipós i predisposa a desenvolupar resistència a insulina (89). Aquests estudis

confirmen la importància de la gliceroneogènesi en el control del reciclatge dels AGL i el control que PEPCK-C exerceix sobre el flux de la via al teixit adipós.



**Figura 16. Gliceroneogènesi en teixit adipós i fetge a partir de piruvat: cicle dels triglicèrids/àcids grassos.**

Al contrari que al teixit adipós, al fetge i al ronyó els glucocorticoids estimulen la transcripció de PEPCK-C. L'efecte diferencial dels glucocorticoids sobre la regulació de PEPCK-C és un exemple de la importància de la regulació específica de teixit i aporta un sentit fisiològic a aquesta divergència: en resposta a glucocorticoids l'increment de PEPCK-C hepàtica incrementa la producció hepàtica de glucosa per la via gluconeogènica i incrementa l'alliberació d'àcids grassos (en forma de VLDL) a través de la gliceroneogènesi, mentre que la reducció de PEPCK-C en teixit adipós limita la reesterificació dels àcids grassos alliberats per la lipòlisi, permetent la seva disponibilitat sistèmica. Tanmateix, nivells alts d'àcids grassos i glucosa en sang són característics de la diabetis, podent

radicar aquí una possible explicació mecanística del paper dels glucocorticoids en diabetis. Els mecanismes moleculars d'aquesta regulació inversa no són coneguts, però sembla evident que implica la interacció dels glucocorticoids amb factors de transcripció específics de teixit. Per exemple, el factor C/EBP $\beta$  sembla estar implicat en la regulació negativa de PEPCK-C en resposta a glucocorticoids a teixit adipós (90), i la seva delecció redueix l'adipositat i protegeix enfront a la obesitat induïda per dieta (91), així com de la diabetis (92).

#### Cataplerosi, metabolisme energètic i metabolisme lipídic

La funció catapleròtica de PEPCK-C és especialment important al fetge durant processos biosintètics com la gluconeogènesi o la lipogènesi, quan el malat o el citrat surten del mitocondri per a generar glucosa o àcids grassos, respectivament. Al ronyó, la gluconeogènesi és un procés catapleròtic, que pren importància en situacions d'acidosi metabòlica, ja que elimina l' $\alpha$ -cetoglutarat generat en l'extracció de glutamina, evitant així l'acumulació d'intermediaris del cicle de Krebs, i mantenint l'activitat d'eliminació de H<sup>+</sup> acoblada al metabolisme de la glutamina. A l'intestí prim PEPCK-C podria exercir un paper en la gluconeogènesi a partir de lactat per aportar glucosa al propi teixit, o també un paper catapleròtic en la metabolització d'aminoàcids de la dieta, com glutamina i aspartat.

Els recents estudis de gensupressió de PEPCK-C desenvolupats als grups del Dr. Mark A. Magnuson i el Dr. Richard W Hanson han demostrat que la PEPCK-C és quelcom més que un enzim exclusivament gluconeogènic: PEPCK-C és enzim essencial per a la vida i exerceix un important paper integrador del metabolisme energètic al fetge. Els efectes de la delecció sistèmica de PEPCK-C sobre l'homeòstasi de la glucosa són clars, ja que causa una severa hipoglucèmia i la mort dins dels dos primers dies de vida del ratolí (93; 94). En canvi, la delecció de PEPCK-C exclusivament al fetge no només no resulta letal, sinó que els ratolins es mantenen euglicèmics fins i tot en dejunis perllongats (95), qüestionant la contribució de l'activitat PEPCK-C en el control de la glucèmia en dejuni. No obstant, tot i que la delecció de PEPCK-C en fetge en compromet clarament la gluconeogènesi hepàtica a partir de precursors gluconeogènics (lactat, piruvat, alanina, però no glicerol) no es poden descartar mecanismes compensatoris intra- i extrahepàtics per al manteniment de l'euglicèmia, que podrien incloure un efecte combinat de reducció de la utilització de la glucosa a nivell sistèmic i un increment de la producció de glucosa extrahepàtica (96). Addicionalment, el flux d'activitat PEPCK és necessari per al manteniment del cicle de Krebs i la producció de poder reductor, necessari per a la subseqüent producció d'ATP. L'absència d'activitat PEPCK-C hepàtica té un efecte directe sobre el metabolisme energètic mitjançant el boqueig del cicle de Krebs (93). Les



conseqüències sobre l'homeòstasi energètica al fetge que se'n deriven són un consum d'oxigen menor, increment de l'estat red-ox mitocondrial i esteatosi hepàtica secundària a un bloqueig en la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos (Figura 63) (97). Aquests resultats, obtinguts en laboratoris independents, suggereixen que l'activitat PEPCK-C al fetge no només controla el flux gluconeogènic sinó que, sobretot, permet el flux del cicle de Krebs (94), amb implicacions diverses en la integració del metabolisme energètic i lipídic del fetge.

### Anaplerosi

La implicació de PEPCK-C en anaplerosi ha estat recentment demostrada mitjançant la sobreexpressió al múscul esquelètic (98). Aquests ratolins transgènics mostraren un ostensible increment en l'activitat física i eren molt més resistents a l'exercici físic. Això és, en part, degut a l'increment en el número de mitocondris i a l'acumul de reserves en forma de triglicèrids al múscul esquelètic. A més, aquests animals ténen un contingut corporal de greix deu vegades inferior i una esperança de vida molt superior en comparació amb els ratolis control. Tot i que encara queda per dilucidar els mecanismes, els autors proposen que, d'una banda la relació directa entre l'activitat PEPCK-C i el cicle de Krebs a través del seu paper en l'anaplerosi al múscul ajuden a explicar la major capacitat d'aquests animals per a oxidar els substrats lipídics durant l'exercici; de l'altra la implicació de l'enzim en la gliceroneogènesi explica la deposició de triglicèrids.

### PEPCK-C en diabetis

Tot i que la contribució relativa de la glicogenòlisi i gluconeogènesi a la producció hepàtica de glucosa en estats no patològics és controvertida, sí que hi ha evidències de la relació entre un increment de l'activitat gluconeogènica hepàtica (99), lligat a un increment patològic de PEPCK-C i la hiperglicèmia diabètica (100). La importància de la PEPCK-C en el desenvolupament de la diabetis és clara i ha estat demostrada en múltiples models animals de resistència a insulina i/o hiperglucèmia concomitant a una sobreexpressió de la PEPCK-C. Valera et al. (101) demostrà que la sobreexpressió PEPCK-C (fins a set vegades per sobre dels nivells normals) en ratolins transgènics es reflexa en un increment de la PHG acompanyada d'hiperglucèmia i hiperinsulinèmia en dejú i intolerància a la glucosa, entre altres signes característics de la diabetis tipus II. Resultats similars van ser descrits posteriorment per Rossella et al. (65) en un model de rata transgènica condicional per al gen *Pck1*. Posteriorment, Sun et al. (102) demostraren que un increment moderat de PEPCK-C

en fetge (de dues vegades) és suficient per a induir un increment en la producció hepàtica de glucosa i resistència a insulina al fetge.

Més evidències de qia relació directa entre PEPCK-C hepàtica i l'etiologia de la diabetis han estat recentment aportades amb la descripció de SNP (single nucleotide polymorphisms) en la zona promotora del gen Pck1 d'elevada incidència a la població diabètica tipus II (103). Aquests SNP es caracteritzen per augmentar l'expressió basal del gen Pck1 in vitro i fan que la insulina sigui incapaç de bloquejar-ne l'expressió. La desregulació del la gliceroneogènesi al teixit adipós i al fetge podria ser un factor determinant en el desenvolupament d'obesitat i diabetis (44), en el que l'activitat PEPCK-C podria tenir una incidència important, tal i com sha descrit en els paràgrafs anteriors. Finalment, s'han trobat associacions entre polimorfismes del gen Pck1 i el contingut de triglicèrids i HDL circulants (104).

---

## TRANSFERÈNCIA GÈNICA COM A EINA TERAPÈUTICA

---

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

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

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

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

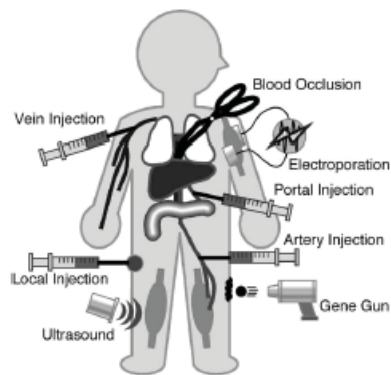
En funció del tipus cel·lular diana, la teràpia gènica es pot dividir en dos tipus:

- Teràpia gènica somàtica: implica la manipulació genètica de les cèl·lules somàtiques afectades per una malaltia. No sense certa polèmica, està en fase d'experimentació clínica des de fa més de quinze anys.
- Teràpia gènica germinal: on les cèl·lules diana són germinals o embrionàries. Potencialment, permetria la prevenció de l'aparició de la malaltia. Està sotmesa a una gran

controvèrsia, no només per motius mèdics (risc intrínsec de genotoxicitat), sinó també per motius ètics (implica la manipulació d'embrions i la transmissió de la modificació genètica introduïda a la descendència). Per tant, actualment ni tan sols es contempla la possibilitat d'un assaig clínic de teràpia gènica germinal, per considerar-se èticament inacceptable.

Hi ha dues vies d'introducció del material genètic a les cèl·lules diana del pacient:

- In vivo: on el material genètic s'injecta, amb o sense vector, de forma local o sistèmica (Figura 17). Per tant, els requisits essencials per al disseny d'un fàrmac de teràpia gènica in vivo són la seva estabilitat en fluids fisiològics, biodisponibilitat a la cèl·lula diana la possibilitat de readministració sense efectes tòxics o immunològics.
- Ex vivo: on la manipulació genètica es fa in vitro sobre cèl·lules en cultiu primari obtingudes d'un explant del pacient. Introduir gens en aquestes cèl·lules és una fita bastant més fàcil, minimitza la toxicitat del vector, permet la verificació i control post-transfecció abans de la reintroducció al pacient i maximitza l'eficiència de transducció.



**Figura 17. Recull d'algunes vies d'administració in vivo del material genètic.** Niindome, T. (2002) Gene Therapy

### Sistemes de transferència gènica

El principal front de batalla en el desenvolupament d'un assaig de teràpia gènica és el delivery. L'èxit d'una estratègia de teràpia gènica depèn de la capacitat del sistema de dirigir de forma eficient,

segura i selectiva el material genètic al teixit diana desitjat. En el disseny de l'estratègia de transferència gènica per a un protocol de teràpia gènica cal tenir en compte quatre factors crítics:

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

El sistema de transferència gènica (vector, via d'administració, etc) d'elecció per a satisfer tots els requisits dependrà de les característiques intrínseques de la malaltia a tractar i del teixit diana. El ventall de sistemes de transferència gènica que s'han desenvolupat fins al moment es poden classificar en dos grups: mètodes virals i mètodes no virals. Cada vector té els seus peculiars avantatges i inconvenients, que el fan apropiat per a una determinada finestra d'aplicacions.

### Mètodes virals

Els virus s'han especialitzat durant milions d'anys d'evolució en la transducció del seu material genètic al nucli de cèl·lules eucariotes, fent-los potents eines per a la transferència gènica al nucli de la cèl·lula diana, raó per la qual la majoria d'assajos clínics es basen en vectors virals. Malauradament, han mostrat greus problemàtiques entre les que es compten la limitació en la mida de l'insert, immunogenicitat, potencial mutagènesi insercional i insuficient especificitat infectiva.

	Avantatges	Inconvenients
<b>Adenovirus (Ad)</b>	Infecta cèl·lules proliferants i quiescents. Facilitat de producció a gran escala. Tamany de l'insert: ( $\Delta E1 < \Delta E1-E3 < \text{gutless}$ ) Alts nivells d'expressió.	Inmunogenicitat: ( $\Delta E1 > \Delta E1-E3 > \text{gutless}$ ). Expressió de curta durada: ( $\Delta E1 < \Delta E1-E3 < \text{gutless}$ ). Possible contaminació per virus helper (gutless).
<b>Adenoassociats (AAV)</b>	Infecta cèl·lules en proliferants i quiescents. No patogènic i poc immunogènic. Ampli tropisme. Als nivells d'expressió.	Limitació de tamany d'insert (4,5 Kb). Efectivitat limitada a la presència d'anticossos preexistents. Possibilitat d'integració a l'atzar.
<b>Retrovirus (Rv)</b>	No hi ha expressió de proteïnes víriques.	Només infecta cèl·lules proliferants. Possibilitat de mutagènesi per inserció. Límit de l'insert (8Kb).
<b>Lentivirus (Lv)</b>	Infecta cèl·lules proliferants i quiescents. Expressió de llarga durada.	Possible toxicitat de les proteïnes víriques d'empaquetament.

**Taula 3. Vectors viral: avantatges i inconvenients.**

### Mètodes no virals

Els problemes de bioseguretat inherents als vectors virals fan dels vector no-virals una alternativa a tenir en compte, ja que presenten clars avantatges en termes de patogenicitat, genotoxicitat, facilitat i cost de producció i no tenen límit en la mida de l'insert. En canvi, de moment, continuen en clar desavantatge en quant a l'eficiència de transducció i estabilitat d'expressió del transgen en aplicacions in vivo. La taula 4 recopila els vectors no virals més comuns, els seus avantatges i inconvenients.

		Avantatges	Inconvenients
<b>DNA nuu</b>		Producció fàcil, segura i econòmica. Administració senzilla.	Susceptibilitat a nucleases plasmàtiques. Resposta immune humoral i citotòxica en resposta al DNA bacterià. Ràpid aclarament per monòcits i cèl·lules endotelials hepàtiques Baixa transducció
<b>Mètodes físics</b>	<b>Gene gun</b>	Aplicabilitat en vacunes de DNA.	Baixa penetrabilitat del DNA al teixit.
	<b>Electroporació</b>	Millora la transducció del DNA plasmídic.	Aplicabilitat superficial (pell, múscul, etc)
	<b>Injecció hidrodinàmica</b>	Facilitat d'injecció. No encapsulament del DNA necessari. Bona eficiència de transducció.	Dany hepàtic transitori. Difícil aplicació en mamífers superiors i en clínica. Expressió transitòria
<b>Mètodes biològics</b>	<b>Lipoplex</b>	Protecció del DNA a nucleases. Facilitat de producció del vector Bona eficiència in vitro.	Greus limitacions in vivo: Heterogeneïtat de les formulacions i inestabilitat dels complexos. Baixa eficiència de transfecció. Pobre especificitat. Toxicitat cel·lular associada al lípid. Tràfic ineficient del DNA cap al nucli.
	<b>Poliplex: polietilenimina (PEI), oligopèptids i poli-L-lisina.</b>	Protecció del DNA a nucleases. Facilitat de producció del vector. Permeten anclar un lligand per a obtenir transferència gènica mediada per receptor (veure addendum). Excel·lents transfeccions in vitro.	Greus limitacions in vivo: Agregació en fluids fisiològics. Toxicitat in vivo associada al PEI. Tràfic ineficient del DNA cap al nucli.

**Taula 4. Mètodes de transferència gènica no virals: avantatges i inconvenients.**

No obstant, en els últims anys, un renovat interès pels vectors no virals ha sorgit en resposta a la necessitat de mètodes de transfecció per a molècules sintètiques com el RNA d'interferència o els oligonucleòtids antisentit. En tot cas, l'aspecte comú a optimitzar, tant en sistemes virals com no virals, és el delivery selectiu i eficient cap al teixit o cèl·lula diana.

## **Productes de teràpia gènica al mercat**

Actualment, tot i que hi ha força fàrmacs basats en DNA o RNA en estadis avançats d'assaig clínic, només dos han estat aprovats per les corresponents agències reguladores:

- **Vitravene®** (fomivirsen, Isis Pharmaceuticals) és la primera droga antisentit del mercat mundial, aprovada per la FDA. La seva seqüència és complementaria al mRNA regió immediata major 2 (IE2 –Immediate Early Region 2) del citomegalovirus humà causant de retinitis. L'eficàcia d'aquest fàrmac, radica en la accessibilitat del teixit diana de manera tòpica.
- **Genicidine** (p53-Ad, Sibiono) és el primer fàrmac de teràpia gènica contra el càncer i consisteix en un Adenovirus de primera generació que sobreexpressa p53 per induir l'apoptosi a cèl·lules tumorals. Es comercialitza a la Xina des del 2004.

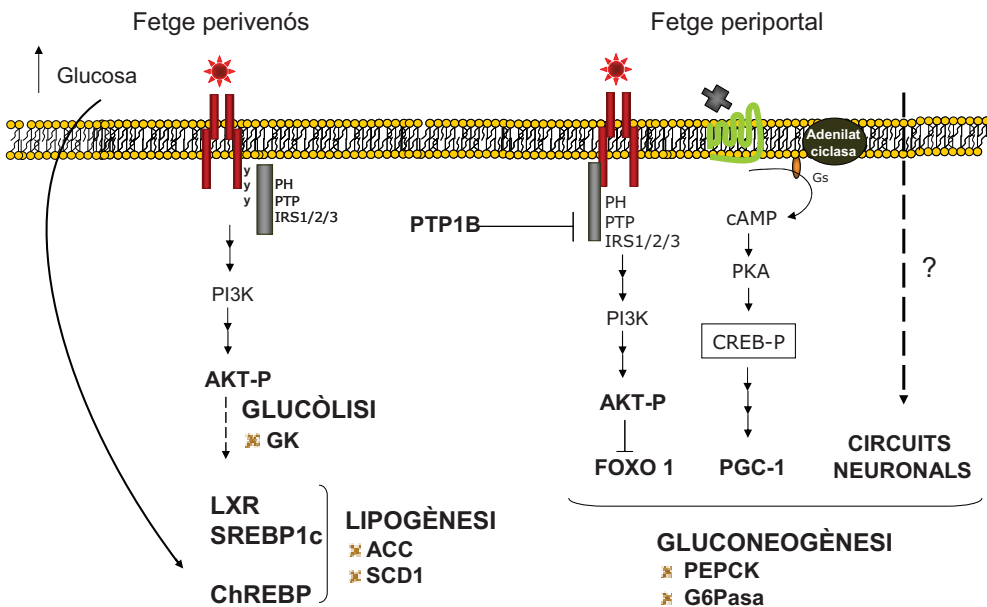
## **Aproximacions de teràpia gènica per la diabetis**

### **Aproximacions de teràpia gènica per la diabetis tipus I**

La destrucció autoimmunitària del pàncreas limita en gran mesura les possibles aproximacions terapèutiques per a la diabetis tipus I. A part de la teràpia substitutòria amb insulina injectada, fins ara, el trasplantament de pàncreas, cèl·lules  $\beta$  o illots de Langerhans, es la única estratègia que ha demostrat una certa efectivitat en la restitució de la normoglicèmia a llarg termini (105). És imprescindible, però, un tractament immunosupressor de per vida, per tal d'evitar rebuig i/o atacs autoimmunitària recurrents contra les cèl·lules  $\beta$  trasplantades. A més a més, la limitació de donants i l'entrada en apoptosi de les cèl·lules durant la manipulació *ex vivo*, restringeixen l'aplicabilitat del trasplantament. Les alternatives que actualment s'estan explorant en el camp de la teràpia gènica inclouen la regeneració de cèl·lules  $\beta$  productores d'insulina a partir de cèl·lules mare pancreàtiques o extrapancreàtiques (106), o la producció d'insulina ectòpica, que implica la manipulació genètica d'òrgans (com fetge o múscul) per a que secretin insulina de forma més o menys fisiològica (107). Fins al moment, però, no existeix cap opció que reemplaci en la clínica a la teràpia substitutòria d'insulina injectada.

## Aproximacions de teràpia gènica per la diabetis tipus II

La diabetis tipus II és una malaltia multigènica i multifactorial la característica principal de la qual és la resistència a la insulina en els teixits perifèrics. La seva complexitat ve donada per els abundants mecanismes fisiopatològics que la defineixen i suposen un important repte per a la terapèutica. Les aproximacions de teràpia gènica per la diabetis van a coll dels descobriments dels mecanismes vies moleculars que modulen les disfuncions de la malaltia als diferents òrgans. Les estratègies de teràpia gènica per aquesta malaltia pateixen, per tant, no només dels problemes inherents a la resta de patologies en quant a la dificultat per a la transferència de gens de manera eficient, selectiva i segura amb els mètodes actualment a l'abast, sinó que, a més a més, es tracta d'una malaltia de la que se'n coneix l'etiologia definida.



**Figura 18.** Possibles dianes de teràpia gènica per a la diabetis tipus II l'òrgan diana de les quals és el fetge.

Donat el paper central del fetge en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa, la potenciació de la sensibilitat a la insulina i la supressió de la producció hepàtica de glucosa són fites comunes en moltes de les diferents estratègies de teràpia gènica de la diabetis tipus II. Amb tal objectiu, s'estan aplicant tecnologies basades en RNA d'interferència, oligonucleòtids antisentit o transgènesi de



diferents proteïnes i factors de transcripció de la via de senyalització d'insulina i/o de la regulació de la gluconeogènesi hepàtica, vehiculitzats tant per vectors virals com no virals. Aquests estudis han resultat essencials per a dilucidar els mecanismes de control de l'homeòstasi energètica al fetge i validar-ne possibles dianes terapèutiques (Figura 18). A continuació es fa un recull dels treballs més rellevants, emfatitzant en aquelles en que l'òrgan diana és el fetge.

#### Sobreexpressió de proteïnes la deficiència de les quals comprometen la patologia

La sobreexpressió de proteïnes per a incrementar la captació i metabolització de glucosa i/o la sensibilitat a la insulina a fetge, múscul o teixit adipós ha estat una estratègia profusament emprada per a validar dianes en la terapèutica de la diabetis.

#### Múscul

En diabetis, la captació de glucosa pel múscul està disminuïda com a conseqüència de la resistència a insulina a aquest teixit. La seva accessibilitat permet l'us de tècniques de transferència gènica no virals, com l'electroporació, o virals, com injeccions intramusculars de virus adenoassociats (AAV1). Existeixen múltiples evidències de que és possible incrementar la capacitat de captació de glucosa a través de la sobreexpressió de **glucoquinasa** en múscul ja sigui mitjançant electroporació (108) o vectors adenovirals (109), tot i que l'efectivitat de reversió de la simptomatologia diabètica i de l'obesitat varia segons el model animal diabètic emprat (110-112).

D'altra banda, la secreció de nivells basals d'**insulina** en múscul obtinguda per transgènesis resulta en un increment en la captació muscular de glucosa (108), tot i que no és capaç de corregir la hiperglucèmia quan s'indueix diabetis experimental. Anant un pas més enllà, en un intent de generar un sistema "sensor de glucosa", l'expressió conjunta de nivells basals d'**insulina i glucoquinasa** en múscul esquelètic, permeté el manteniment de la normoglucèmia en un model de diabetis experimental, tant en alimentació com en dejuni, possiblement degut a un efecte sinèrgic (glucoquinasa en múscul i insulina a nivell sistèmic) compost per un increment de la captació de glucosa a múscul i una disminució de la producció hepàtica de glucosa (113).

#### Fetge

També ha estat profusament estudiada la potenciació de l'activitat enzimàtica de **glucoquinasa** hepàtica, ja sigui per mètodes farmacològics o genètics, amb la intenció d'incrementar-ne la captació de glucosa, i obtenir un efecte hipoglucemiant en diabetis. Mentre que els primers resultats

semblaven confirmar aquesta hipòtesi (114; 115), més endavant es posava en dubte la idoneïtat d'aquesta aproximació, ja que la sobreexpressió a llarg termini de glucoquinasa a fetge induïa resistència a insulina i esteatosi hepàtica (116), o també perquè els nivells de sobreexpressió necessaris per a obtenir un efecte hipoglucemiant desemboquen en dislipidèmia (117).

#### Aproximacions basades en oligonucleòtids Antisentit (ASO)

Els antisentit són oligonucleòtids d'RNA, DNA o anàlegs d'àcids nucleics sintetitzats químicament, homòlegs al mRNA diana, al qual s'aparella i en bloqueja la traducció i/o estimula la seva degradació. Després d'una injecció intraperitoneal d'ASO, aquests s'acumulen en fetge i al teixit adipós, però no en múscul. Així, les aproximacions terapèutiques per a diabetis basades en ASO s'han centrat en el fetge com a òrgan diana. En els últims anys la companyia farmacèutica ISIS Pharmaceuticals Inc. ha realitzat un exhaustiu cribatge per a identificar dianes susceptibles d'una intervenció farmacològica per a la diabetis utilitzant ASO de segona generació, es a dir, amb modificacions químiques 2'-O-(2metoxi)etil (2'-MOE) que confereixen resistència a nucleases i una major afinitat d'unió amb el mRNA complementari. Alguns d'aquests ASO, en concret els dirigits contra FOXO1 i PTP1B han aportat resultats positius en estudis preclínic i clínic:

#### Reducció de la gluconeogènesi hepàtica

**FOXO1** La implicació de FOXO1 en diabetis ha estat àmpliament demostrada. En fetges d'animals obesos resistent a insulina, l'expressió de FOXO1 està incrementada i la seva localització és predominantment nuclear (118-120), corresponent a una major activitat transcripcional sobre els gens gluconeogènics G6pc i Pck1. Samuel et al. (120) han demostrat recentment que una modesta silenciament de FOXO1 al fetge de ratolins obesos utilitzant oligonucleòtids antisentit (ISIS188764), s'acompanya de la reducció del mRNA de G6Pasa i PEPCK-C i una baixada en la PHG, que repercuteix en la millora de la glucèmia, tolerància a glucosa, insulinèmia i sensibilitat a insulina no només en fetge, sinó també en teixit adipós. Malgrat que la reversió del fenotip diabètic no és total degut a limitacions en la biodistribució i/o eficiència en el delivery i/o activitat antisentit de l'ASO, aquests estudis recolzen la hipòtesi de que una actuació basada en la reducció de la gluconeogènesi hepàtica en teixits sensibles a insulina pot contribuir a la millora de la resposta perifèrica a insulina.

#### Restabliment de la senyalització d'insulina al fetge

**PTP1B** es una proteïna fosfatasa que interacciona i desfosforila el receptor de la insulina, IRS-1 i IRS-2, regulant negativament la cascada de senyalització d'insulina, els nivells de la qual estan

incrementats en pacients obesos amb resistència a insulina (41; 121-123). En estudis amb ratolins obesos que patien una marcada resistència a insulina (ob/ob), l'ús d'oligonucleòtids antisentit permeté reduir els nivells de proteïna PTP1B en fetge i teixit adipós a la meitat, igualant-los als nivells de l'animal sa (ob/-). També es reduïren els nivells de glucosa i insulina plasmàtiques en alimentació i millorà la tolerància a glucosa i insulina (124). Aquests resultats demostren que la normalització dels nivells de PTP1B a fetge i teixit adipós és suficient per a millorar la senyalització d'insulina, suggerint que una modulació farmacològica de PTP1B en teixits sensibles a insulina pot ser una bona diana terapèutica en el tractament de la diabetis tipus II. De fet, la silenciació de PTP1B al fetge a través d'oligonucleòtids antisentit (ISIS 113715) està ja en fase II d'investigació clínica per a avaluar la seva capacitat de millorar o restablir la sensibilitat a insulina en pacients amb diabetis tipus II (125). La repercussió de la formulació en l'estabilitat, biodistribució i funcionalitat de la molècula és un factor essencial en el disseny del fàrmac de DNA com ha quedat demostrat recentment en estudis que utilitzen noves modificacions en la seqüència nucleotídica (enllaç 2'-O,4'-etilè; ENA) que reporta major estabilitat i funcionalitat, tant en percentatge de silenciació, com en efecte hipoglucemiant quan es compara amb la mateixa seqüència sense modificacions químiques (126).

#### Reducció de la lipidosi hepàtica

L'acumulació de lípids al fetge en estats prediabètics està directament lligat al desenvolupament de resistència a insulina i a una producció hepàtica de glucosa incrementada, ambdós elements clau en la patogènesi de la diabetis tipus II. La reducció de la lipidosi hepàtica podria, per tant, ser una altra estratègia terapèutica en aquestes situacions patològiques. En aquesta línia els enzims hepàtics lipogènics podrien resultar una diana terapèutica. L'acetil-CoA carboxilasa (**ACC**) catalitza la síntesi de malonil-CoA. L'existència de dues isoformes d'ACC (ACC1, que es localitza en teixits lipogènics com fetge i teixit adipós; i ACC2, que es localitza en teixits oxidatius com fetge, cor i múscul esquelètic) suggereix l'existència de dos pools metabòlics de malonil-CoA, un implicat en la regulació de la lipogènesi de novo a fetge i teixit adipós, i l'altre implicat en la regulació de l'oxidació d'àcids grassos a fetge i múscul (127-130). Per a suprimir la lipogènesi hepàtica, pre tant, seria necessària la inhibició d'ambdues isoformes (131). Savage et al. (132) han demostrat recentment que la inhibició d'ACC1 i ACC2 en fetge utilitzant un oligonucleòtid antisentit contra ambdues isoformes, té un efecte sinèrgic en la inducció d'oxidació d'àcids grassos, comparat amb la silenciació de cada una de les isoformes per separat. Això, en models animals de fetge gras induït per dieta, repercuteix en menor lipidosi i producció hepàtica de glucosa i una millora de la sensibilitat hepàtica a insulina.

### Aproximacions basades en RNA d'interferència (RNAi)

La tecnologia del RNAi ha sorgit en la última dècada com a alternativa als ASO per a la silenciació de post-transcripcional del mRNA diana, per la seva major potència i versatilitat. En l'apartat RNA d'interferència es descriu en detall la biologia, el mecanisme i les aplicacions d'aquestes molècules. A continuació es descriuen algunes aproximacions terapèutiques basades en el RNAi com a eina:

Reducció de la gluconeogènesi hepàtica

**PGC-1 $\alpha$**  (peroxisome proliferator activated  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ). En models murins de diabetis la seva expressió està incrementada, resultant en una activació constitutiva de la gluconeogènesi hepàtica i de l'oxidació d'àcids grassos. La silenciació de PGC-1 $\alpha$  en ratolins db/db resulta en la reducció del mRNA dels enzims gluconeogènics (PEPCK-C i G6Pasa), normalització de la glucèmia en dejuni i millora de la tolerància a glucosa i sensibilitat hepàtica a insulina (73)

**G6Pasa** (glucosa-6-fosfatasa) és l'últim enzim en la ruta gluconeogènica, responsable de la síntesi de glucosa a partir de glucosa-6-fosfat. Aquest enzim està regulat a nivell de transcripció per hormones com ara la insulina (regulació negativa), el glucagó i els corticoides (regulació positiva). La inhibició farmacològica de G6Pasa produeix una disminució significativa de la glucèmia i un increment del glicogen hepàtic (133-135). Huang et al. (136) varen demostrar que la silenciació d'aquest gen a fetge mitjançant un adenovirus codificant per shRNA contra G6Pasa aconseguia replicar els canvis sobre l'homeòstasi de la glucosa associats a la gensupressió del gen, demostrant que aquesta estratègia és suficient per induir canvis farmacològicament rellevants en el context d'un animal sà, i per tant, posant les bases per un estudi pre-clínic posterior en models de diabetis.

Finalment, s'ha descrit recentment la silenciació específica de **ChREBP** a fetge, utilitzant un shRNA vehiculitzat per un adenovirus. ChREBP regula, en resposta als nivells de glucosa, i de manera sinèrgica amb SREBP1c, la transcripció d'enzims glucoítics (L-PK) i lipogènics (ACC i FAS), modulant, per tant, la producció de novo d'àcids grassos al fetge. Aquesta estratègia millora la esteatosi hepàtica i la resistència a insulina en models murins d'obesitat i diabetis (137).

Aquest conjunt d'estudis posen de manifest la importància del fetge com a òrgan central en la homeòstasi de la glucosa a nivell sistèmic. La modulació de la GNG hepàtica i la millora de la sensibilitat a insulina al fetge constitueixen, per tant, una fita terapèutica a explorar en profunditat per la teràpia de la diabetis tipus II.

---

## RNA D'INTERFERÈNCIA

---

El fenomen de silenciament gènic post-transcripcional (PTGS) va ser descrit a la dècada dels 80 en plantes. Es va anomenar co-supressió al silenciament de gens tant exogens com endogens observats degut a l'expressió d'un transgen homòleg. Aquest mateix fenomen, observat en fongs (*Neurospora crassa*) es va batejar com a quelling. No va ser fins el 1998, que es descrigué per primer cop el fenomen de RNA d'interferència (RNAi) (138), quan Andrew Fire i Craig Mello, en estudis de silenciament amb oligonucleòtids antisentit realitzats en *Caenorhabditis elegans*, observaren que quan les cadenes antisentit i sentit eren anellades (dsRNA) s'obtenia un efecte molt més potent que amb les seqüències antisentit. A més a més, aquest efecte de silenciament de l'expressió gènica era sistèmic i heretable en *Caenorhabditis elegans*. Aquest descobriment va ser mereixedor del Premi Nobel en Fisiologia i Medicina l'any 2006. Avui sabem que la molècula efectora responsable del silenciament gènic post-transcripcional en plantes i fongs era també RNAi.

### **Mecanisme d'acció del RNA d'interferència: del dsRNA al siRNA**

El mecanisme d'acció del RNA d'interferència és un camp subjecte a intensa investigació i, tot i que no es coneix encara en profunditat, se'n comença a treure l'entrellat. El model que explica el mecanisme del RNA d'interferència es basa en dues fases (Figura 19):

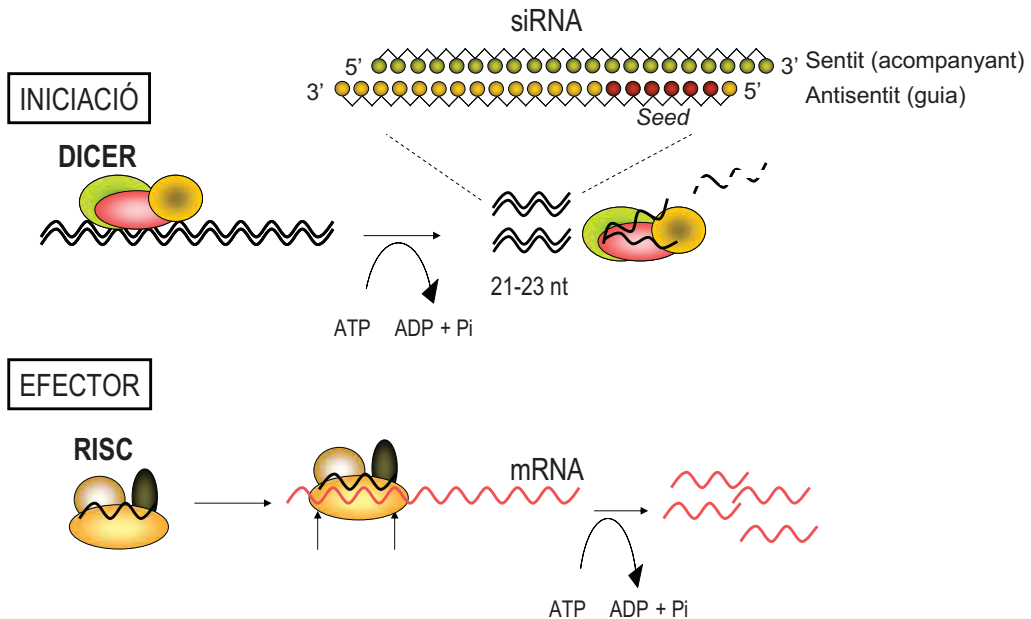
#### 1. Fase iniciadora

El dsRNA és processat al citoplasma pel complex enzimàtic DICER (amb dominis d'unió a RNA, helicassa i RNasa III) en una reacció depenent d'ATP. Com a resultat, es generen petites molècules de 21 a 23 nucleòtids amb estructura bicatenària, extrems protuberants 5'-fosfat i 3'-hidroxil: els anomenats small interference RNA (siRNA), que són les molècules mediadores del procés de silenciament (139; 140)

#### 2. Fase efectora

L'activitat helicasa de DICER separa les cadenes d'RNA. Només una de les dues cadenes serà incorporada al complex RISC (RNA-induced silencing complex) i activada per fosforilació, mentre que l'altra serà degradada. Aquesta cadena s'anomena cadena guia i és la que determina el reconeixement del mRNA diana, el qual serà degradat en la posició 12 del siRNA gràcies a l'activitat endonucleasa depenent d'ATP (141). Recentment s'ha identificat la unitat catalítica del complex,

Argonata 2. DICER i Argonata 2 tenen un domini PAZ a través del qual interaccionen els complexos, facilitant el traspàs de la cadena guia del siRNA (142). El reconeixement del mRNA diana està guiat pels 6-8 nt contant a partir del nt 2 de l'extrem 5' de la cadena guia (regió seed). Desaparellaments a la regió seed aboleixen la funcionalitat del siRNA, mentre que si són fora d'aquesta regió, poden ser tolerats, no sense afectar la funcionalitat del siRNA (143; 144).

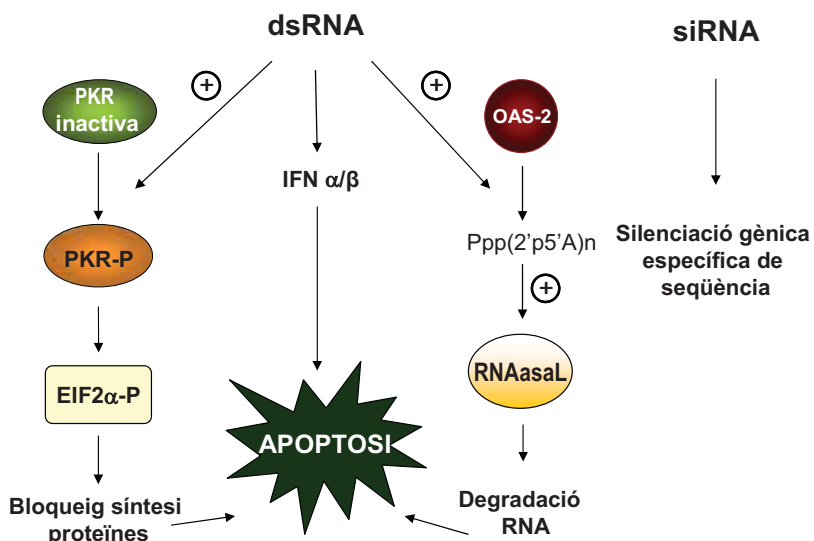


**Figura 19. Model mecànic del RNAi.** Adaptat de Hammond, SM, et al. (2001), Nature Reviews Genetics.

### RNAi en mamífers: funcions biològiques i aplicació: siRNA i miRNA

En mamífers, la resposta a un dsRNA de cadena llarga (>30 nucleòtids) exogen implica l'activació de la via de PKR (proteïna quinasa dependent d'RNA) i/o interferó, bloquejant de forma global i inespecífica la síntesi de proteïnes, i de RNAsaL, degradant de forma inespecífica els mRNA cel·lulars, conduint finalment al suïcidi cel·lular, tal i com es descriu a la Figura 20. La troballa que la interferència de RNA es pot aconseguir en models experimentals de mamífer a través de la introducció dels siRNA sintètics sense inducció d'aquesta resposta inespecífica (140) va obrir les portes a l'aplicació del RNA d'interferència per a l'estudi de la funció dels gens i la validació de dianes

terapèutiques, tant en sistemes in vitro basats en cèl·lules de mamífer, com en models animals in vivo.



**Figura 20.** El dsRNA citoplasmàtic activa vies d'estrès cel·lular en mamífers. Adaptat de McManus, MT et al. (2002), Nature Reviews Genetics.

En mamífers, l'RNA d'interferència realitza una funció essencial en la regulació de l'expressió gènica a través dels micro RNA (miRNA) endògens. Els miRNA són una família de RNA de doble cadena no codificants, de petit tamany (~22 nt), expressats endògenament i altament conservats amb una potent funció reguladora a nivell post-transcripcional (145).

La biogènesi dels miRNA consta de quatre passos (Figura 21):

1. Els miRNA són transcrits per la RNA polimerasa II com a trànscrip primaris de cadena llarga (pri-miRNA), amb extrems 5'-cap, 3'-poliadenilats i estructura stem-loop.
2. Al nucli, la RNAasa III Drosha processa els pri-miRNA en molècules precursors d'uns 60-70 nucleòtids amb estructura de forquilla i aparellament imperfecte (pre-miRNA) que deixa un extrem 5'-fosfat i dos nucleòtids protuberants a l'extrem 3'-OH, característic dels siRNA.
3. Els pre-miRNA són exportats al citoplasma a través del transportador Exportina 5 (Exp 5), un transportador nuclear Ran-GTP dependent.

- Un cop al citoplasma, el complex DICER processa els pre-miRNA a miRNA madurs de 21-23 nucleòtids, amb els dos extrems 5'-fosfat i dos nucleòtids protuberants a l'extrem 3'-OH; una mena de siRNA d'aparellament imperfecte.

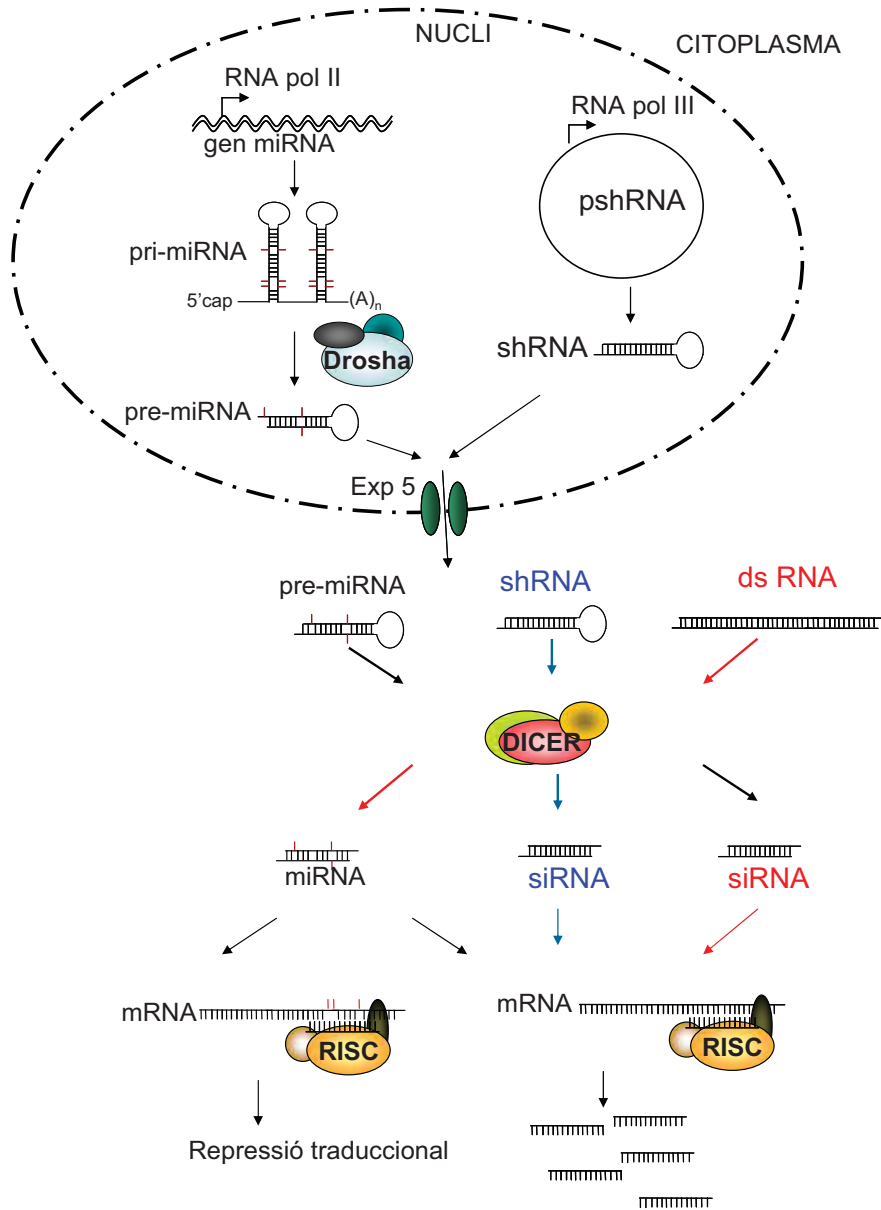


Figura 21. La biogènesi dels miRNA, siRNA i shRNA convergeix en DICER



El mecanisme d'acció dels miRNA és paral·lel al dels siRNA, implicant també al RISC i la seva activitat RNAasa III, quan la homologia entre el miRNA i el mRNA diana és completa, o bloquejant la traducció quan la homologia no és completa (Figura 21).

Fins al moment s'han descrit centenars de miRNA en mamífers, que podrien estar regulant fins a un 30% dels gens. Les dianes per a aquests miRNA es troben a les regions 3'UTR (3' no traduïdes). Alguns miRNA s'han pogut relacionar directament amb la regulació de gens implicats en desenvolupament, diferenciació de precursors neuronals i hematopoiètics, proliferació i apoptosi, posant de manifest la important implicació dels miRNA en càncer. Alguns miRNA s'han relacionat també en regulació del metabolisme d'aminoàcids, lípids i glúcids (146).

### **Molècules efectores de RNAi en mamífers: siRNA vs shRNA**

La interferència d'RNA in vivo en cèl·lules de mamífer es pot aconseguir tant a través de la introducció de siRNA sintètics, com generats a partir de vectors d'expressió. Alternativament, aprofitant el paral·lisme en el processament dels siRNA i els miRNA es poden generar vectors d'expressió de shRNA. Els shRNA són molècules precursors dels siRNA, amb estructura de forquilla similar a la dels pre-miRNA (Figura 21). Òbviament, els vectors d'expressió de siRNA i shRNA poden ser tant virals com no virals.

#### 1. siRNA sintètics.

A diferència que en *C. elegans*, en cèl·lules de mamífer no s'ha descrit un mecanisme d'amplificació dels siRNA. Per tant, els siRNA sintètics hi aporten un efecte transitori degut a la dilució en les successives divisions cel·lulars. No obstant, tant per la seva facilitat de síntesi, com per la seva inocuitat en l'aplicació sistèmica i la possibilitat de modificar de l'esquelet per tal de millorar la farmacocinètica i la biodistribució, les aplicacions terapèutiques basades en siRNA sintètics són les que es troben més avançades.

#### 2. Vectors d'expressió.

L'obtenció de vectors d'expressió de shRNA implica la clonació del shRNA davant d'una seqüència promotora de RNA polimerasa III. Això, permet la generació de múltiples molècules efectores, cosa que aporta un efecte més perllongat i potent que els siRNA sintètics. A més, en aplicacions in vivo, en les que es requereix quantitats superiors de siRNA, l'ús de vectors resulta molt més econòmic. Tot

i que és possible la generació de siRNA a partir de vectors d'expressió basats en promotors en tàndem o bidireccionals, el mètode més emprat per a generar molècules de RNAi a partir de vectors d'expressió són les shRNA (Figura 22).

Els shRNA es poden expressar in vivo a partir dels promotors de snRNA, transcrits per la polimerasa III, U6 (147; 148) o H1 (149). Sota el control del promotor es troben les seqüències sentit i antisentit de el mRNA diana (19-29 nucleòtids cada una) unides per un hairpin (6-9 nucleòtids). L'inici de transcripció el marca una guanina, i la finalització, una seqüència de 4 o 5 timidines. Aquesta estructura en forquilla, d'uns 70-80 nucleòtids, similar als pre-miRNA, és reconeguda pel DICER i processada en una molècula del tipus siRNA (149) (Figures 21 i 22).

La segona generació de vectors de RNAi es basa en la transcripció de shRNA incorporats en un transcrypt quimèric de miRNA sota un promotor de RNA polimerasa II, que són processats per Drosha/DICER (150). Quan la supressió total del producte gènic resulta letal, l'ús de promotors induïbles o específics de teixit resulta crucial.

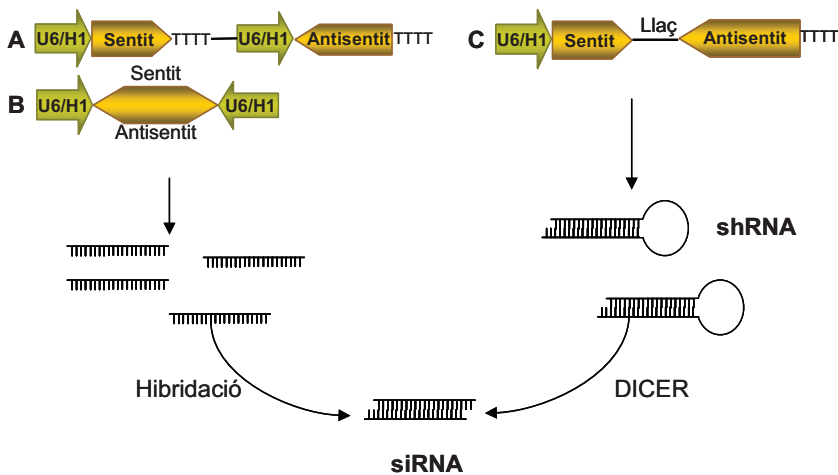


Figura 22. Obtenció de siRNA a partir de vectors d'expressió.

La inclusió dels casets d'expressió de shRNA en vectors virals permet obtenir eficiències de transducció elevades i especificitat de teixit, ja sigui gràcies al tropisme natural o a través del pseudotipatge dels virus. Els vectors lentivirals (per la capacitat d'infecció de cèl·lules quiescents i d'integració del genoma viral, que assegura un expressió a llarg termini), els adenovirals (pel seu tropisme hepàtic i facilitat d'obtenció) i adenoassociats (pel seu tropisme hepàtic i estabilitat) són els

més emprats. No obstant, cada soca viral té els seus avantatges i inconvenients, tal i com s'ha descrit anteriorment (Taula 3).

### Disseny de seqüències efectores de siRNA

Els primers estudis de silenciament amb siRNA en cèl·lules de mamífer van evidenciar una gran variabilitat en l'efectivitat de silenciament amb diferents seqüències contra una mateixa diana, de manera que només una fracció dels siRNA dissenyats resultaven eficients (151). Per tant, a part de la complementarietat amb el mRNA diana (que pot ser 3' UTR, 5'UTR, però sobretot regió codificant), altres factors determinen la funcionalitat dels siRNA. Estudis exhaustius de correlació entre la seqüència del siRNA i la seva funcionalitat han trobat característiques en la seqüència que contribueixen de forma significativa al potencial de silenciament dels siRNA (152). Un d'aquests estudis ha ponderat l'efecte dels motius estructurals sobre la funcionalitat, establint així un sistema de valors per a seleccionar una seqüència eficient mitjançant l'assignació d'un valor a cada paràmetre (-1, 0 o 1) (Taula 5). S'ha proposat que un valor de 6 o més incrementa substancialment la probabilitat de silenciar efectivament el gen diana.

Crítéri	Valor si es compleix	Valor si no es compleix
Contingut en G i C: 30-50%	1	0
A o U a les posicions 15-19	5 (1 per cada posició)	0
No repeticions internes	1	0
A en posició 19	1	0
A en posició 3	1	0
U en posició 10	1	0
A o U en posició 19-	0	-1
No G en posició 13	0	-1

**Taula 5. Criteris per al disseny d'una seqüència de siRNA funcional.** Adaptat de Reynolds A.D. et al. (2004) Nature Biotechnology

A mesura que s'ha anat aprofundint en del coneixement el mecanisme d'acció dels siRNA i s'han realitzat estudis estadístics sobre seqüències de siRNA validades, s'han anat coneixent factors que poden determinar l'efectivitat d'una seqüència del siRNA, permetent el disseny racional de les seqüències efectores. Alguns d'aquests factors es detallen a continuació:

1. Incorporació de la cadena guia a RISC.

La inestabilitat termodinàmica a l'extrem 5' de la cadena antisentit del dúplex facilita que l'activitat helicasa hi actui preferentment i incorpori aquesta cadena al complex RISC (el que s'ha anomenat asimetria funcional del siRNA). Així, el disseny de siRNA amb un extrem 5' inestable en la cadena antisentit (ric en A o U) n'afavoreix la incorporació de la cadena al RISC, incrementant la seva efectivitat. Pel contrari, quan la inestabilitat és major a l'extrem 3' de la cadena, la funcionalitat del siRNA és menor degut a la ineficiència en la càrrega de la cadena antisentit al RISC (153).

L'ús de seqüències de siRNA sintètics de 27-30 nucleòtids (D-siRNA) o shRNA de 29 nucleòtids pot aportar una major potència de silenciament que les seqüències equivalents de 21 nucleòtids (154; 155). Aquestes molècules són processades per DICER, donant lloc als siRNA efectors de 21 nucleòtids. S'ha especulat que l'increment en la potència de silenciament radica en la implicació de DICER en el mecanisme de processament dels D-siRNA i els shRNA, conferint una major eficàcia en la incorporació de la cadena guia a RISC. Sembla, doncs, que el traspàs de la cadena guia des de DICER cap al RISC és un pas determinant per a l'eficiència de silenciament.

## 2. Efectivitat del tall de el mRNA diana

Les diferències d'activat silenciadora entre diferents seqüències de siRNA contra un mateix mRNA poden també ser degudes a diferències en l'accessibilitat del complex RISC a la regió diana del mRNA, conseqüència d'estructures secundàries del RNA (151; 153). Per tant, estudis predictius de l'estructura secundària del mRNA diana podrien ajudar a millorar el disseny del siRNA. Existeixen múltiples algorismes accessibles per al disseny de siRNA i shRNA que incorporen aquestes premisses i altres regles com l'alineament de les seqüències amb el GeneBank® per a descartar efectes inespecífics o off-target (Taula 6).

Laboratori	URL
<b>Ambion</b>	<a href="http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html">www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html</a>
<b>Dharmacon</b>	<a href="http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx">www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx</a>
<b>Dr. Hannon</b>	<a href="http://katahdin.cshl.org:9331/portal/scripts/main2.pl">katahdin.cshl.org:9331/portal/scripts/main2.pl</a>
<b>Integrated DNA Technologies (IDT)</b>	<a href="http://scitools.idtdna.com/RNAi">scitools.idtdna.com/RNAi</a>
<b>Invitrogen</b>	<a href="http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaexpress">rnaidesigner.invitrogen.com/rnaexpress</a>
<b>Dr. McManus</b>	<a href="http://web.mit.edu/mmcmanus/www/home1.2/files/siRNAs.htm">web.mit.edu/mmcmanus/www/home1.2/files/siRNAs.htm</a>
<b>Quiagen</b>	<a href="http://www1.qiagen.com/Products/GeneSilencing/CustomSiRna/SiRnaDesigner.aspx">www1.qiagen.com/Products/GeneSilencing/CustomSiRna/SiRnaDesigner.aspx</a>
<b>Sfold Algorithm</b>	<a href="http://sfold.wadsworth.org.pl">sfold.wadsworth.org.pl</a>
<b>Dr. Tuschl</b>	<a href="http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html">www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html</a>
<b>Whitehead Institute</b>	<a href="http://jura.wi.mit.edu/siRNAext">jura.wi.mit.edu/siRNAext</a>

Taula 6. Llocs web d'interès per al disseny de siRNA o shRNA efectius.

## **Efectes deleteris que poden associar-se a l'ús de RNAi en mamífers**

En un principi, donada l'especificitat en el reconeixement de seqüència dels siRNA, es considerava el RNA d'interferència com a un fenòmen lliure d'efectes secundaris. No obstant, a mesura que s'ha anat aprofundint en el coneixement del mecanisme silenciador dels siRNA i estudiant la seva aplicació en cèl·lules de mamífer, han anat apareixent possibles efectes deleteris derivats del mecanisme d'acció dels siRNA. En conseqüència, aquests són factors a tenir en compte, a part de la complementarietat i l'activitat contra el mRNA diana, a l'hora de dissenyar la seqüència de siRNA i d'avaluar el fenotip derivat d'un experiment de silenciació. A continuació es descriuen aquests efectes deleteris:

### **Silenciament inespecífic per complementarietat parcial (off-target)**

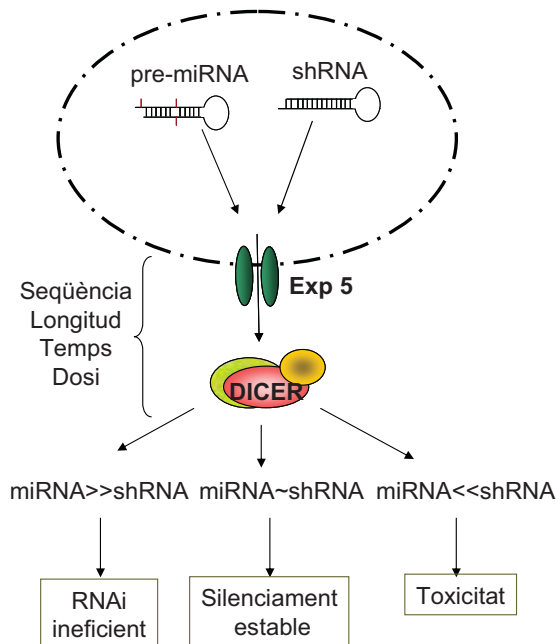
Inicialment, el fenòmen de silenciament post-transcripcional s'havia descrit com a altament específic de seqüència; tant que, tot i poder existir una certa tolerància (144), només un desparellament entre el siRNA i el mRNA diana podia arribar a abolir l'efecte de silenciament (140; 151). No obstant, l'any 2003 es va descobrir, per primera vegada, l'existència d'un efecte off-target associat al RNAi; definit com a la silenciació inespecífica i dosi-depenent de gens no relacionats amb el gen diana (156). En aquells moments es desconeixia la causa d'aquests efectes off-target, aixecant les alarmes sobre l'especificitat del procés de silenciament mediat per siRNA. Estudis mecanístics posteriors van revelar que aquests efectes off-target estan associats a la complementarietat parcial entre la regió seed (tant de la cadena sentit com la antisentit) i regions 3'UTR en la gran majoria dels casos, però també amb regions codificants dels mRNA (157; 158). Aquests tipus de reconeixement del mRNA diana és una reminiscència del mecanisme dels miRNA. Per tant, aquest efecte off-target és dependent de seqüència, no pas del vector emprat per a vehiculitzar el siRNA (158), i implica l'activitat del RISC. El coneixement del mecanisme de silenciament ha permès l'adopció d'estratègies de prevenció i minimització de l'efecte off-target depenent de seqüència aplicables en el moment del disseny de la molècula efectora, basades en : a) el disseny in silico de seqüències minimitzant la homologia en la regió seed amb gens inespecífics i b) modificacions químiques de l'esquelet del nucleotídic del siRNA.

**Activació de la resposta immune innata**

Tot i que els siRNA són, en teoria, massa curts per a activar les vies de defensa enfront a RNA de doble cadena (Figura 20), s'ha descrit l'activació d'aquestes vies en resposta, tant a algunes seqüències de siRNA sintètics (159), com de vectors d'expressió de shRNA (160). Tot i que el mecanisme d'activació d'aquestes vies per siRNA o shRNA encara no està descrit completament, l'estimulació dels Toll like receptor (TLR) de forma dependent de seqüència sembla estar-hi implicada. Diferents grups han associat els motius 5'-GUCCUCAA-3' (161) i 5'-UGUGU-3' (162) i 5'UGGC3' (163) a aquest tipus de toxicitat. El disseny de seqüències de siRNA que no continguin aquests motius i la incorporació de modificacions químiques sobre l'esquelet nucleotídic del siRNA poden ajudar a evitar aquesta activitat immunoestimuladora.

**Saturació maquinària endògena de processament miRNA**

El fet que la maquinària de processament dels shRNA sigui compartida amb els miRNA endògens (Figura 21) pot comportar efectes tòxics derivats de la saturació d'aquesta maquinària compartida.



**Figura 23. Model de competició dels shRNA per saturació de la via endògena de processament dels miRNA.** Adaptat de Grimm et al. (2006) Nature.

Aquest tipus de toxicitat és dosi dependent, ja que implica la saturació de la maquinària de processament dels shRNA exògens i dels miRNA endògens a nivell de la Exportina-5 (Exp5) i té com a conseqüència la disminució dels nivells de miRNA endògens i de la seva funcionalitat, així com la desaparició progressiva dels siRNA processats i del seu efecte silenciador (164). La severitat de la toxicitat sembla estar determinada per la dosi (quantitat de shRNA processat per la cèl·lula), la persistència en el temps de l'expressió dels shRNA exògens i la seqüència de shRNA. Per tant, per a evitar aquest problema sembla ser necessari testar diferents dosis per a avaluar la capacitat endògena de processament dels siRNA i delimitar el llindar màxim a partir del qual els shRNA poden resultar tòxics (Figura 23).

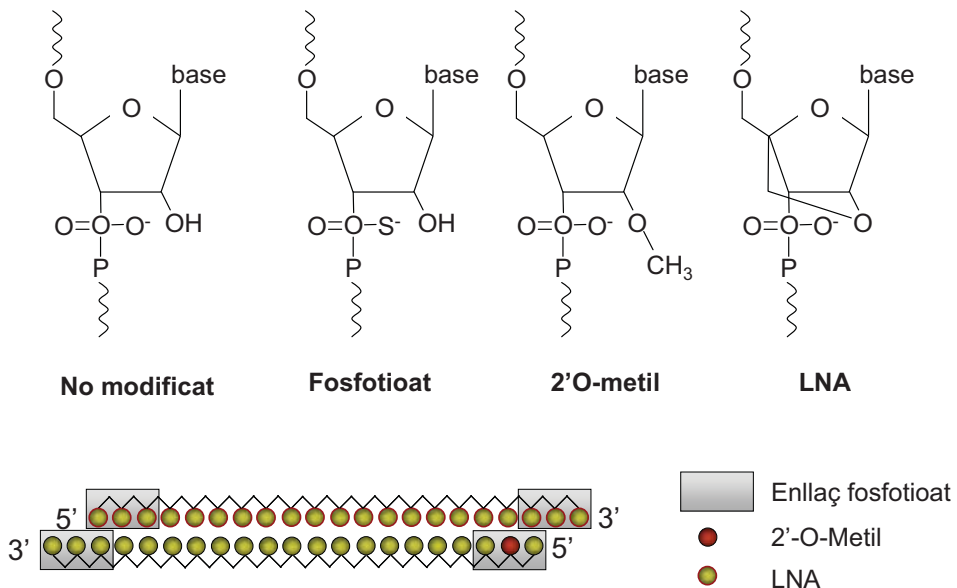
### **RNAi in vivo**

La vehiculització efectiva a la cèl·lula diana continua sent el principal repte de les aplicacions in vivo de la tecnologia de RNAi. En les aplicacions in vivo, l'administració sistèmica de siRNA sintètics nus (no modificats) resulta altament ineficient: els siRNA nus tenen una vida mitja de minuts en plasma, ja que són ràpidament degradats per endo- i exonucleases plasmàtiques i excretats pel filtrat glomerular renal. Aquest factor, sumat a la incapacitat del siRNA nuu sense modificar per a ser dirigit de manera específica al teixit diana després d'una injecció intravenosa, explica perquè menys de l'1% del siRNA és captat pel teixit diana. Algunes aproximacions per a superar aquestes limitacions farmacològiques inclouen modificacions químiques sobre l'esquelet del siRNA, la conjugació amb macromolècules de naturalesa catiònica i la inclusió en vectors no virals. Aquestes estratègies hi confereixen resistència a nucleases, en milloren la biodistribució i/o la biodisponibilitat i permeten reduir les dosis, i l'efecte off-target. L'ús de vectors virals de shRNA o de mètodes físics (com la injecció hidrodinàmica) també han aportat eficiències de transducció satisfactòries per a la validació de dianes terapèutiques en models animals.

### **Modificacions químiques sobre l'esquelet del siRNA**

Les modificacions químiques sobre l'esquelet del siRNA que s'han aplicat són les mateixes que en el passat s'havien emprat per a estabilitzar els oligonucleòtids antisentit (Figura 24) amb la salvedat que els siRNA han de mantenir els paràmetres estructurals a la cadena guia, per tal de permetre al RISC mantenir la seva activitat. A més, l'extrem 5' de la cadena guia ha de mantenir-se lliure per permetre la seva fosforilació per RISC prèvia a la seva activació:

- **Enllaç fosfotioat:** la introducció d'enlaços fosfotioéster als extrems 3' de la cadena sentit i antisentit confereix estabilitat enfront a exonucleases plasmàtiques. Aquestes són ben tolerades sense afectar la funcionalitat del siRNA.
- **2'-O-Metil:** la substitució 2'-O-Metil-ribosil confereix estabilitat enfront a endonucleases plasmàtiques. Estudis recents han demostrat que la substitució d'un únic residu 2'-O-Metil-ribosil a la posició 2 de la cadena guia redueix molt eficientment la silenciació inespecífica de gens deguda a la complementarietat amb la regió seed, sense afectar a la funcionalitat del siRNA (144; 165). Les modificacions 2'-O-Metil són útils també per a minimitzar la estimulació de la resposta immune innata mediada per la interacció dels siRNA amb els TLR (166).
- **siLNA** (locked nucleic acid): són anàlegs de d'RNA amb un enllaç metilè entre la posició 2' i 4'. Les modificacions LNA a la cadena sentit o a la regió 3' de l'antisentit confereixen una major estabilitat en sèrum i redueix l'efecte off-target sense perdre la funcionalitat (167).
- **sisilNA** (small internally segmented interfering locked nucleic acid): en aquestes molècules, la cadena sentit, a més de les modificacions LNA està fragmentada en dos segments. Aquestes noves molècules han reportat una gran persistència de l'efecte in vivo (168).



**Figura 24. Estructures químiques de les modificacions sobre els enllaços fosfodiéster i la ribosa als siRNA.** El panell inferior es mostra un esquema d'un siRNA modificat químicament per a millorar la seva estabilitat en sèrum i minimitzar els efectes deleteris.



## Conjugació dels siRNA

La conjugació dels siRNA amb macromolècules o la seva inclusió en vectos no virals, de naturalesa polimèrica o lipídica, confereix resistència enfront a les nucleases plasmàtiques i evita la seva filtració glomerular. S'incrementa així l'estabilitat i la vida mitja en circulació, permetent que els complexos s'introdueixin de forma passiva preferentment als teixits vascularitzats com el fetge, pulmó, melsa, ronyó o teixit tumoral angiogènec. El repte es troba en aconseguir la captació selectiva del siRNA pel teixit diana. Només en cas que els conjugats o complexos incorporin un lligand específic per a un receptor de membrana, l'entrada a la cèl·lula serà activa (per endocitosi mediada per receptor) i exclusiva en aquelles cèl·lules que l'expressin. Les estratègies de vehiculització dels siRNA sintètics més exitoses són:

- **Colesterol:** la conjugació del siRNA amb colesterol a la regió 3' de la cadena sentit en millora l'estabilitat al fluxe sanguini i, per tant, les propietats farmacocinètiques (els conjugats de colesterol s'uneixen a la albúmina sèrica, protegint el siRNA de les nucleases plasmàtiques i de la filtració al ronyó) i la biodisponibilitat (gràcies a la lipofilitat aportada pel colesterol). No obstant, la manca d'una vehiculització selectiva al teixit diana continua sent una limitació en aquesta estratègia, fent necessàries dosis no farmacològiques (50 mg/Kg) per a obtenir efectes terapèutics (169).
- **Lipoplex:** l'ús de lípids catiónics per a mediar l'entrada a la cèl·lula in vitro està molt extès. No obstant, cal extremar les precaucions en el seu ús in vivo, ja que aquest tipus de vectors poden induir la via d'interferó (162).
- **Liposomes:** la encapsulació dels siRNA en liposomes (SNALP, Stable nucleic Acid Lipid Particle; comercialitzat per Invitrogen, o Smarticles; comercialitzades per IDT) estabilitza els complexos en la circulació, incrementant-ne la vida mitja. L'epiteli fenestrat de fetge facilita la captació passiva dels complexos circulants, afavorint l'acumulació quasi exclusiva i total al fetge després d'una única injecció intravenosa a dosis farmacològiques (1-4 mg/kg). Aquesta estratègia ha mostrat activitat terapèutica a mig termini (fins a 11 dies) en models primats no humans d'hipercolesterolèmia amb un siRNA contra ApoB (170). Roman pendent d'explorar si aquestes formulacions poden vehiculitzar els siRNA a teixits extrahepàtics.
- **Atelocol·lagen:** la barreja de siRNA amb atelocol·lagen (producte de la digestió del col·lagen amb pepsina) sembla estabilitzar el siRNA al sèrum, allargant fins a tres vegades

la vida mitja del complex respecte del siRNA nuu, i proporciona una biodistribució preferencial al tumor, per mecanismes no descrits (171).

- **Nanopartícules de polímers catiónics:** d'entre els polímers catiónics, el PEI és el més emprat per a vehiculitzar siRNA. La compactació de siRNA amb PEI resulta en nanopartícules d'uns 100 nm que, estabilitzat amb PEG i unit a un lligand específic de teixit tumoral, aconseguí una més selectiva i eficient captació pel teixit tumoral (172). No obstant, igual que els lípids catiónics, el PEI pot contribuir a l'efecte tòxic independent de seqüència (173). D'altra banda també s'ha reportat la hiperreativitat deguda a la generació d'anticossos en resposta a l'exposició a nanopartícules estabilitzades amb PEG (174; 175). Nanopartícules capaces de mediar endocitosi mediada per receptor d'una forma i eficient, estables en fluids fisiològics sense PEG en la seva formulació podrien bypassar aquestes limitacions. A l'addendum del present treball s'aprofundirà més en aquest aspecte.
- **Protamina-Fab:** la unió per forces electrostàtiques del siRNA a proteïnes de fusió compostes per protamina-regió Fab d'un anticòs específic d'un antígen (receptor) de membrana han permès vehiculitzar els siRNA cap a una població cel·lular tumoral (176) o de limfòcits T (177), però no a altres teixits, després de la injecció intravenosa del complex amb unes dosis farmacològiques (1-4 mg/Kg). Calen, però, estudis que aprofundeixin sobre la biodistribució i toxicitat del vector.
- **Immunoliposomes:** Són la última sofisticació i consisteixen en liposomes amb un anticòs específic a la superfície, amb la finalitat d'aconseguir l'entrada del siRNA a la cèl·lula diana. Aquests liposomes s'han mostrat capaços de mediar in vivo la internalització del siRNA específicament a una població cel·lular limfocitària amb alta eficiència i selectivitat després d'una injecció sistèmica (178). L'avantatge d'aquests liposomes radica en la gran capacitat de càrrega de siRNA per partícula, l'estabilitat en circulació que el liposoma confereix al siRNA i la gran selectivitat en la biodistribució que l'anticòs confereix al sistema.

### Aplicacions terapèutiques basades en RNA d'interferència

La tecnologia del RNA d'interferència ha revolucionat la investigació biomèdica, fent realitat la promesa de 20 anys d'estratègies antisentit i permetent, a través de la silenciament gènica, identificar la funció dels gens i validar-los com a potencial diana terapèutica. No es d'estranyar, doncs, que nombroses companyies farmacèutiques estiguin ja invertint capital i esforços en desenvolupar teràpies basades en la tecnologia del RNAi, algunes de les quals han arribat ja a fases avançades

d'estudi clínic. En els darrers anys s'ha publicat una miriada de treballs en els que s'ha emprat la tecnologia del RNAi com a estratègia terapèutica (179; 180). La taula 7 recopila els estudis més significatius en els que s'ha aplicat la tecnologia de RNAi per a la silenciació d'un gen endogen en un model de malaltia.

Model	Diana	Òrgan	Vehicle	Ruta	Efactor	Ref.
<b>Infecció</b>						
Hepatitis B	HBV	Fetge	SNALP	i.v.	siRNA	(181)
Ebola	Ebola-L	Fetge	PEI	i.p.	siRNA	(182)
<b>Apoptosi</b>						
Hepatitis	Fas	Fetge		IH	siRNA	(183)
Hepatitis B	Caspasa 8	Fetge		IH	shRNA	(184)
<b>Inflamació</b>						
Colitis	TNF $\alpha$	Colon	Lipoplex	i.r.	siRNA	(185)
<b>Malalties neurodegeneratives</b>						
Esclerosi amiloide lateral	SOD1	Local	Lentivirus	i.m.	shRNA	(186)
Ataxia espinocerebral	Ataxina 1	Local	AAV	i.c.	shRNA	(187)
Hungtinton	Hungtintina	Local	AAV	i.c.	shRNA	(188)
Alzheimer	BACE1	Local	Lentivirus	i.c.	shRNA	(189)
<b>Metabolisme</b>						
Obesitat	AGRP	SNC		i.c.	siRNA	(190)
Hipercolesterolemia	ApoB	Fetge	Colesterol	iv.	siRNA	(169)
Hipercolesterolemia	ApoB	Fetge	SNALP	i.v.	siRNA	(170)
<b>Tumors</b>						
Sarcoma de Ewing	EWS-FL1	Tumor	Nanopartícula-Transferrina	i.v.	siRNA	(191)
Xenograft subcutani	VEGF	Tumor	Atelocolagen	i.v.	siRNA	(192)
Xenograft	Gp160	Tumor	Protamina-Fab	i.v.	siRNA	(176)
<b>Affeccions oculars</b>						
NVC	VEGF	Ull	salí	i.vt.	siRNA	(193)
DME	VEGF	Ull	Lipoplex	i.vt.	siRNA	(194)

**Taula 7. Selecció d'exemples d'aplicacions terapèutiques de RNAi en mamífers.**

DM; degeneració macular, IH; Injecció hidrodinàmica, i.p.; Injecció intraperitoneal, i.c.; Injecció intracraneal, s.c.; Injecció subcutània, i.m. Injecció litramusculat, i.r.; Injecció intrarectal, i.n. administració intranasal, i.vt. injecció intravitreal, i.p. injecció intraespinal, AGRP; Agouti related peptide, NVC Neovascularització coroidal induïda per làser, DME degeneració macular induïda per làser.

El potencial terapèutic de les estratègies basades en RNA d'interferència està compromès per l'eficiència en el delivery en termes de dosi, especificitat i estabilitat en fluids fisiològics, en el cas de la molècula sintètica; i en termes de seguretat, en el cas de l'ús de vehicles virals i no virals. És per aquesta raó que els estudis que han arribat a fase clínic són aquells basats en aplicacions locals, mentre que els esforços per a les aplicacions sistèmiques es centren en la optimització de la vehiculització al teixit diana.

La facilitat de transfecció del fetge tant per mètodes virals com no virals (siRNA o shRNA) n'ha facilitat la validació de dianes farmacològiques actives en aquest òrgan. De fet, les primeres demostracions del potencial terapèutic de la tecnologia dels siRNA in vivo va venir de la mà de Song (183) i Zender (195), els quals van demostrar que la injecció hidrodinàmica de siRNA proporcionava quasi un 100% de silenciament en fetge in vivo contra dianes endògenes (receptor de Fas i caspasa 8, respectivament), protegint contra el dany hepàtic en models animals de toxicitat aguda. No obstant, aquest mètode de transfecció proporciona una limitada eficiència de transducció i una expressió de curta durada (196). El tropisme dels adenovirus recombinants cap al fetge (197) ha permès el delivery de shRNA en fetge de forma més eficient i relativament més persistent, permetent estudis de validació de dianes.

---

**OBJECTIUS**

---



La producció de glucosa hepàtica està sotmesa a un estricte control hormonal i de substrats (198). En individus sans, la gluconeogènesi hepàtica és responsable de fins a un 90% de la glucèmia en dejuni (199). En individus diabètics, l'increment de la gluconeogènesi hepàtica, secundària a la resistència a insulina o a la manca de secreció de la hormona, repercuteix de forma directa sobre l'homeòstasi de la glucosa (100). A més, s'ha observat una relació directa entre la sobreexpressió de PEPCK-C, l'increment de la producció hepàtica de glucosa i el desenvolupament d'hiperglucèmia en models animals (101; 102). Malgrat aquest conjunt d'evidències, la validació de PEPCK-C com a diana terapèutica per a disminuir la producció hepàtica de glucosa en la diabetis no ha estat investigada en profunditat fins al moment.

Una intervenció sobre PEPCK-C amb aquesta finalitat hauria de ser, sota en nostre criteri, específica de fetge per varies raons. D'una banda, la delecció sistèmica de l'enzim resulta letal (93; 95). D'altra banda, la rellevància de l'enzim sobre el metabolisme energètic, no només al fetge, sinó a teixits extrahepàtics, ha estat recentment demostrada en models murins de genosupressió i transgènesi de l'enzim (87-89; 98). Finalment, la inhibició farmacològica de l'activitat PEPCK-C, amb un inhibidor no competitiu de l'enzim com és l'àcid 3-mercaptocolínic (SK&F 34288, Smith Kline & French Laboratories), redueix la producció hepàtica de glucosa (200) i la glucèmia (201), efecte que va acompanyat d'acidosis làctica, segurament secundària a la inhibició de l'activitat enzimàtica al ronyó.

No obstant, una gran controvèrsia ha esdevingut en els últims anys sobre la preponderància de la gluconeogènesi hepàtica en el control de la glucèmia. Els estudis amb ratolins genosuprimits per PEPCK-C hepàtica han demostrat que la supressió de l'enzim de manera específica al fetge, aboleix la gluconeogènesi sense afectar al control de la glucèmia en repòs (93; 95; 96), i han demostrat la rellevància de l'activitat PEPCK-C en el metabolisme energètic a través del manteniment del flux del cicle de Krebs (94; 97).

Amb aquests precedents, ens vam interessar per estudiar els efectes aguts sobre l'homeòstasi energètica i de la glucosa derivats la modulació de l'activitat PEPCK-C hepàtica a fi de validar aquest enzim com a una possible diana per a una estratègia terapèutica per a controlar la hiperglucèmia diabètica. Per a assolir aquest objectiu general, s'ha aplicat tècniques de RNA d'interferència sobre diferents models animals de la patologia diabètica.

Els objectius concrets del present treball són:

- 1. Disseny i validació de seqüències actives i segures d'RNA d'interferència contra la PEPCK-C de ratolí.**
- 2. Vehiculització selectiva i efectiva de les molècules d'RNA d'interferència al fetge.**
- 3. Silenciament *in vivo* de PEPCK-C hepàtica de forma específica i exclusivament al fetge.**
- 4. Avaluació de la rellevància directa de la PEPCK-C sobre el control de la glucèmia mitjançant la reducció de l'activitat PEPCK-C hepàtica en un model animal lliure de l'acció de la insulina.**
- 5. Avaluació de l'impacte sobre l'homeòstasi de la glucosa i la sensibilitat a insulina de la reducció de l'activitat PEPCK-C hepàtica en el context de diabetis tipus II.**
- 6. Avaluació de l'impacte sobre l'homeòstasi energètica de la silenciament de la PEPCK-C en fetge en el context de la diabetis tipus II.**
- 7. Estudiar els possibles mecanismes de regulació de la via gluconeogènica hepàtica en resposta a la reducció de la PEPCK-C al fetge.**



---

**RESULTATS**

---



## **CAPÍTOL 1**

---

**Disseny de seqüències de shRNA i estudi de l'efecte sobre l'homeòstasi de la glucosa de la silenciació de PEPCK-C al fetge de ratolins diabètics en absència d'insulina**

---



---

## INTRODUCCIÓ

---

Donat el potencial teòric de disminuir la producció hepàtica de glucosa a través d'una intervenció puntual a nivell de PEPCK-C, ens vam proposar l'objectiu de reduir el contingut hepàtic de PEPCK-C. Per a valorar el reflex de la reducció de l'activitat PEPCK-C sobre la glucosa post-absortiva vam utilitzar un model murí de diabetis tipus I, com és la diabetis induïda per estreptozotocina. La manca d'insulina en aquest model ens ha de permetre, teòricament, dilucidar de manera directa els efectes de la reducció de PEPCK-C al fetge sobre l'homeòstasi post-absortiva de la glucosa, determinada principalment pel flux gluconeogènic.

Per a disminuir el contingut de PEPCK-C de forma específica al fetge es va optar per la tecnologia del RNA d'interferència. La injecció hidrodinàmica va ser el primer mètode d'elecció per a la introducció de siRNA sintètics (202) i de vectors d'expressió de shRNA (203) a fetge. La primera constatació de silenciament d'un gen cromosòmic endogen en un model animal in vivo emprant shRNA va venir del laboratori del Dr. Hannon (204). Aquests autors demostraren que, mitjançant la injecció hidrodinàmica de vectors d'expressió de shRNA (pSHAG), es pot arribar a obtenir una silenciació quasi completa de la proteïna verda fluorescent (GFP) en fetge de ratolins transgènics. Un estudi coetani, comparatiu entre shRNA de diferents longituds van demostrar que els shRNA de 29 nucleòtids de llargària eren més eficients que els de 21 nucleòtids (147) per una raó encara no dilucidada. Per tant, per a silenciar de forma específica la PEPCK-C hepàtica en models murins es va optar per emprar l'aproximació de la injecció hidrodinàmica (per la seva versatilitat) de vectors d'expressió de shRNA amb una seqüència de 29 nucleòtids d'homologia al mRNA diana, en aquest cas Pck1 (per la seva major eficiència respecte als de 21 nucleòtids).

---

## RESULTATS

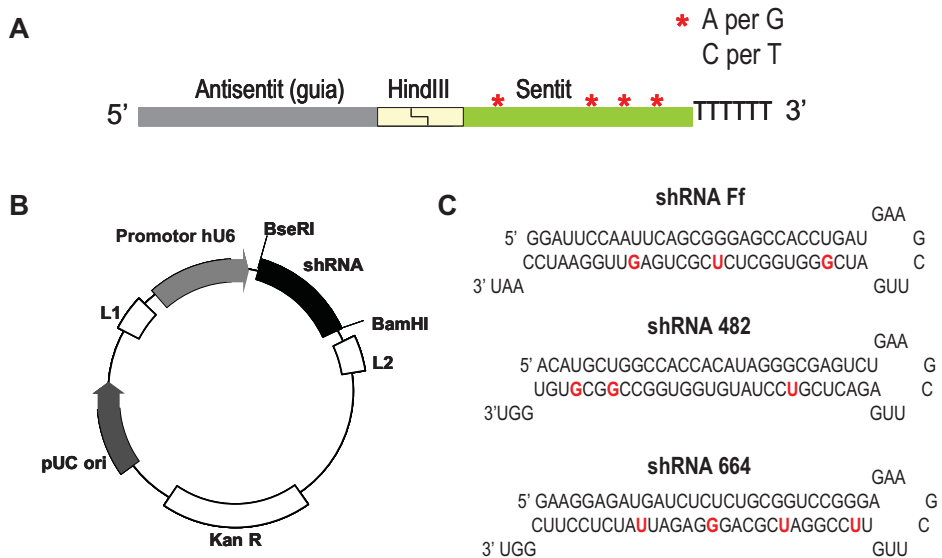
---

### **Disseny i generació de vectors d'expressió de shRNA dirigits contra PEPCK-C**

Per a dur a terme l'objectiu de validar la silenciació de PEPCK com a diana terapèutica per la diabetis, el primer pas necessari és generar les eines que permetin abordar els reptes experimentals plantejats. En el present estudi, pels motius explicats a l'apartat introductori del present capítol, es va optar pel disseny de vectors d'expressió de shRNA de 29 nucleòtids. Quan ens plantegem l'ús de la tecnologia d'RNA d'interferència per a silenciar el gen objecte del nostre estudi, l'ús de hRNA ofereix, respecte de l'ús de siRNA sintètics, la possibilitat d'obtenir les molècules efectores a partir d'un vector d'expressió, amplificant-ne la potència i la durada de l'efecte. No obstant, requereix la generació prèvia dels vectors d'expressió. Per a obtenir vectors d'expressió de shRNA cal clonar una seqüència codificant per la cadena sentit i l'antisentit del shRNA unides per un linker en un vector d'expressió sota el control d'un promotor adequat (Figura 22 i 25). Addicionalment, donat que no totes les seqüències de siRNA dissenyades aporten la mateixa eficiència de silenciament, és recomanable testar la capacitat de silenciament de més d'una seqüència i seleccionar aquella que porti major eficiència a una dosi menor.

Les seqüències de shRNA emprades en el present treball es van dissenyar emprant l'algoritme publicat pel grup del Dr. Greg Hannon (147; 204) que es pot trobar a la pàgina <http://katahdin.cshl.org:9331/homepage/portal/scripts/main2.pl>. Es van dissenyar dues parelles d'oligonucleòtids de DNA codificants per shRNA dirigits contra la regió codificant de la PEPCK-C de *Ratus norvegicus* i de *Mus musculus*. Els oligonucleòtids dissenyats es van designar, en funció de la localització de l'inici de la regió d'homologia comptant a partir de codó d'inici del cDNA de Pck1, 482 i 664 respectivament. La seqüència nucleotídica de cada parell d'oligonucleòtids es detalla a la secció de Materials i Mètodes. Aquests oligonucleòtids tenen una seqüència tal, que en ser transcrits es genera un RNA amb una estructura de forquilla on, de 5' a 3', hi trobem una seqüència antisentit de 29 nucleòtids - el loop- i la seqüència sentit (Figura 25 B). Per a evitar plegaments de les cadenes sobre si mateixes degut a complementarietats internes entre la regió sentit i antisentit de l'oligonucleòtid, fet que dificultaria l'anellament correcte dels oligonucleòtids durant el clonatge, l'algoritme introdueix alguns aparellaments G-U a la seqüència sentit (en vermell a les seqüències de shRNA de la Figura 25 A). Aquestes modificacions en la seqüència de l'oligonucleòtid impedeixen l'anellament entre bases de DNA, però no entre bases de RNA. Per tal de facilitar la selecció dels

clons positius (aquells que hagin introduït les seqüències al plasmidi pSHAG-1), la forquilla que connecta la regió sentit amb l'antisentit conté una diana de restricció HindIII (Figura 25 A). Cada parella (A i B) d'oligonucleòtids es van anellar i en van clonar en un plasmidi d'expressió (pSHAG-1) que conté el promotor del gen U6 humà (snRNA present als splicesomes), transcrit per RNA polimerasa III. El clonatge es va fer al les dianes BseRI i BamHI de pSHAG-1 gràcies a la inclusió, als extrems 3' i 5' dels oligonucleòtids, de les bases adequades per tal de generar extrems cohesius amb aquestes dianes. Les construccions resultants es van anomenar pSHAG-482 i pSHAG-664, respectivament. Com a seqüència control inespecífica, es va emprar un shRNA específic per al mRNA de la luciferasa de *Photinus Pyralis* (pSHAG-Ff), cedit pel laboratori del Dr. Hannon.



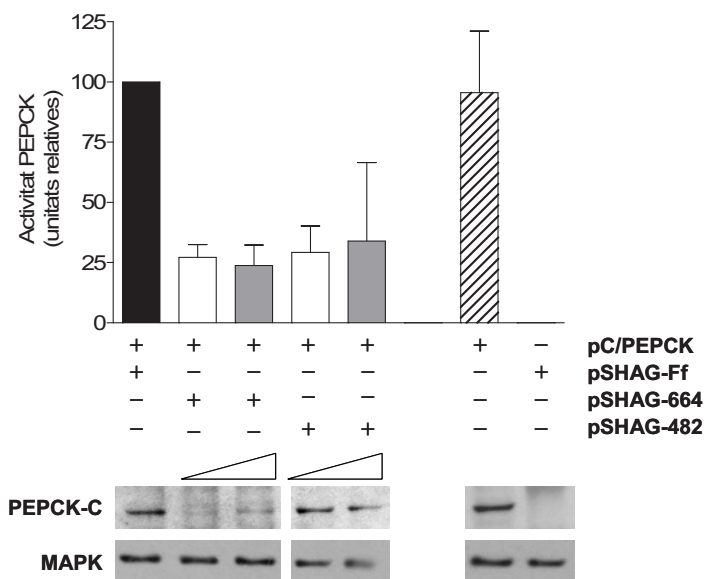
**Figura 25. Vectors d'expressió de shRNA dissenyats.** **A:** Disseny dels oligonucleòtids de shRNA. Els asteriscs indiquen la modificació de bases en la cadena sentit per a evitar aparellaments entre la cadena sentit i antisentit dels oligonucleòtids de DNA durant el clonatge. La representació correspon a l'oligonucleòtid A **B:** Plasmids pSHAG codificant per les seqüències de shRNA. **C:** Seqüències dels shRNA contra PEPCK-C de rata i ratolí (codificat per pSHAG-482 i pSHAG-664) i del shRNA control contra la luciferasa de *Photinus pyralis* (codificat per pSHAG-Ff).

Per a obtenir un efecte de silenciament específic sobre el gen diana és essencial descartar possibles efectes de silenciament inespecífic o off-target dependents de seqüència. Aquest tipus de silenciament off-target s'explicaria per dos factors: a) tolerància en front a aparellaments incorrectes puntuals entre el mRNA diana i el siRNA (144; 151) i b) el reconeixement entre la regió seed dels siRNA i els 3'UTR d'un gen no específic (157; 163). Per tal d'assegurar la selectivitat de les seqüències dissenyades pel

mRNA diana vàrem voler descartar una possible homologia de les seqüències dels shRNA Ff, 482, 664 amb altres gens dels genomes de *Mus musculus* i *Rattus norvegicus*. Per a això es va fer un MEGABlast (alineament de seqüències petites) contrastant les seqüències sentit i antisentit dels shRNA amb les seqüències de mRNA del GenBank d'ambdues espècies. En cap cas es van trobar homologies superiors al 50%, ni corresponents a la regió seed amb cap regió codificant diferent de Pck1 en ambdues espècies descartant, teòricament, la possibilitat de tenir efectes off-target.

### Silenciament de la PEPCK-C mitjançant shRNA in vitro

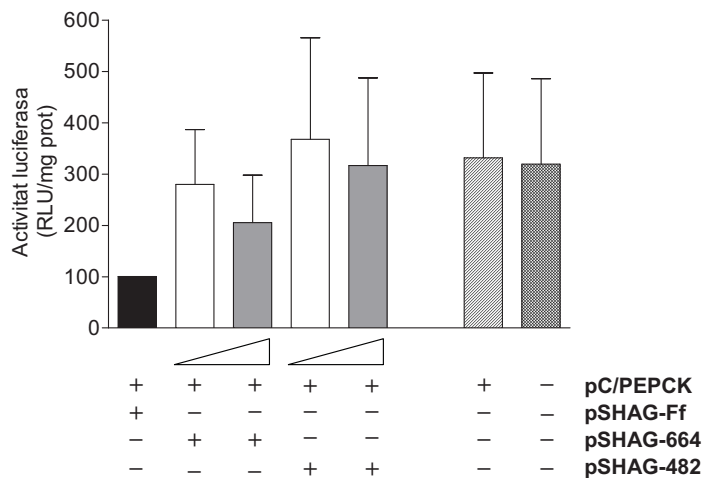
Per confirmar la funcionalitat i especificitat de les seqüències dissenyades in vitro, es va emprar la línia cel·lular d'hepatoma humà Huh7, que no expressa endògenament PEPCK. Es van realitzar experiments de co-transfecció del plasmidi d'expressió de PEPCK-C amb les diferents construccions de plasmidis pSHAG a diferents relacions molars. La capacitat de silenciament dels dos shRNA es mostra a la Figura 26.



**Figura 26. Silenciament in vitro de PEPCK pels vectors pSHAG-482 i pSHAG-664.** Una quantitat constant del plasmidi pC/PEPCK-C (2.25  $\mu$ g) es va co-transfectar amb diferents coeficients molars de pSHAG-482, pSHAG-664 (1:0, 1:6 i 1:12) o pSHAG-Ff (a una relació molar 1:12). Com a control intern de transfecció es va afegir a cada barreja de transfecció una quantitat constant de pGL3 (1  $\mu$ g). Com a vector de transfecció es va emprar PEI. Passades 48 hores, es van mesurar les activitats enzimàtiques PEPCK i luciferasa. L'activitat enzimàtica PEPCK es va normalitzar per l'eficiència de transfecció (estimada per l'activitat luciferasa) i s'expressa com la relació activitat PEPCK/activitat luciferasa (A). L'efecte de silenciament es va confirmar sobre el contingut proteic de PEPCK-C per Western blot (B).



Tant els nivells de proteïna com l'activitat enzimàtica va disminuir en presència de pSHAG-664 i pSHAG-482, arribant a un llindar màxim d'un 80%. En comparació, pSHAG-482 resultà menys eficient a les mateixes proporcions, però sobretot, va aportar un silenciament menys reproducible entre els diferents experiments realitzats. Aquest experiment previ suggereix la millor idoneïtat de la seqüència 664 per a la silenciació de PEPCK-C. En contraposició, pSHAG-Ff no altera l'activitat enzimàtica relativa, ni la quantitat de proteïna PEPCK-C citoplasmàtica, confirmant que l'efecte és específic de seqüència. Addicionalment, l'observació que, a grans trets i salvant la variabilitat en l'eficiència de transfecció interexperimental (que depèn de múltiples factors), l'activitat luciferasa disminueix en les co-transfeccions amb pSHAG-Ff i manté constant en les co-transfeccions amb pSHAG-482 i pSHAG-664 (Figura 27) suggereix també que la silenciació dels shRNA Ff, 482 i 664 és específica. Finalment, cap de les seqüències utilitzades sembla estar induint toxicitat, com evidencien els nivells estables del normalitzador endogen MAPK.



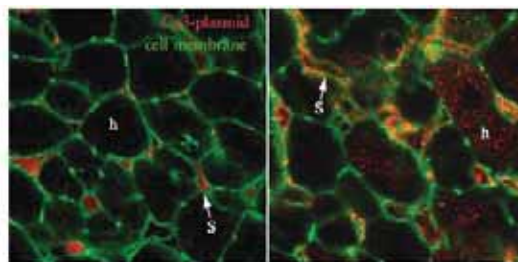
**Figura 27. Silenciament in vitro de luciferasa pel vector pSHAG-Ff.** Activitat luciferasa mesurada en els extractes cel·lulars obtinguts tal i com es descriu a la figura 15.

### Avaluació de la funcionalitat dels vectors pSHAGs in vivo transduïts mitjançant la tècnica de transferència gènica hidrodinàmica

El mètode d'injecció hidrodinàmica es basa en la injecció intravascular d'un gran volum de solució salina que conté el DNA nuu. La primera demostració de que la pressió hidrostàtica pot incrementar

l'eficiència en la transferència gènica als hepatòcits in vivo la va donar Budker et al. en 1996 (205) mitjançant una injecció intraportal d'un mil·lilitre de solució en ratolins. Adaptacions de la metodologia per a transfectar el fetge en altres models animals (rata i gos) (206), múscul esquelètic en rata (207) i primats (208) han estat també explorades. La injecció hidrodinàmica a la vena caudal va ser descrita per primera vegada per Liu et al. (209) seguit molt d'aprop per Zhang et al. (210). Es tracta d'una injecció ràpida (entre 5 i 8 segons) d'una solució salina (10% v/p) de DNA nuu a través de la vena caudal i proporciona una transducció transitòria de fins a un 40% dels hepatòcits. També es transdueixen, amb una eficiència 4-5 ordres de magnitud inferior altres òrgans, com el ronyó, el pulmó, la melsa i el cor. Un cert grau de dany hepàtic agut es reflexa en un increment de transaminases sèriques, però ràpidament (al segon dia després de la injecció) torna a nivells basals.

Estudis cinètics i de biodistribució demostren que, després de la injecció intravenosa de baix volum, el DNA és ràpidament degradat per les nucleases plasmàtiques i s'acumula a les cèl·lules hepàtiques no parenquimals (Figura 28). En canvi, la injecció hidrodinàmica, tot i tenir una cinètica similar, proporciona una ràpida internalització del DNA als hepatòcits (196; 209).

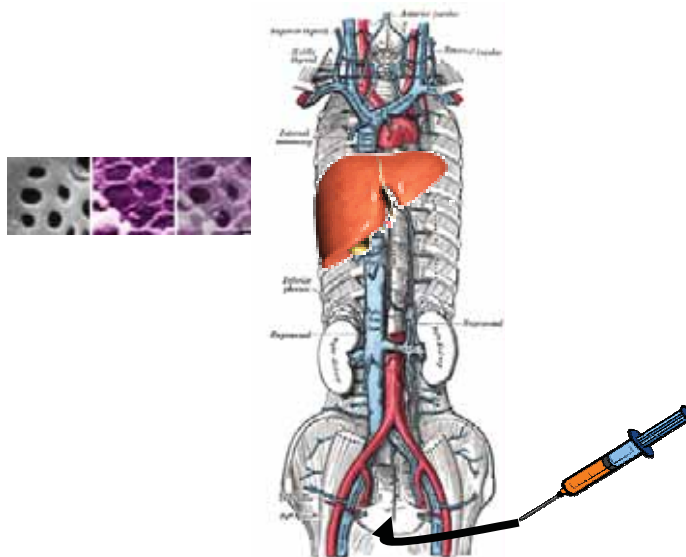


Lewis et al (2005) Methods Enzymol

**Figura 28. Localització hepàtica d'un plasmidi injectat intravenosament a la vena de la cua.** Quan el plasmidi fluorescent és injectat amb un volum baix (foto de l'esquerra), aquest, o els seus productes de degradació, s'acumulen a cèl·lules no parenquimals (s). Quan la injecció és hidrodinàmica (foto de la dreta) el DNA és captat principalment pels hepatòcits (h).

El volum injectat a la vena caudal desemboca a la vena cava, el flux injectat sobrepassa la capacitat cardíaca causant un increment de la pressió, que resulta en un flux retrògrad cap al fetge a través de la vena hepàtica. L'estructura flexible del fetge pot assimilar grans volums, equilibrant la pressió hidrostàtica i permetent l'accés del DNA als hepatòcits a través de l'epiteli fenestrat dels seus capil·lars (Figura 29). El mecanisme exacte pel qual el DNA entra als hepatòcits no ha estat del tot dilucidat. Diversos estudis apunten a que l'entrada als hepatòcits està mitjançada per un procés físic no específic (211) batejat com a "hidroporació" per Zhang et al. (212) en el que l'alta pressió

provocada per la injecció causaria petits porus a la membrana dels hepatòcits fent-los hiperpermeables al DNA (213).

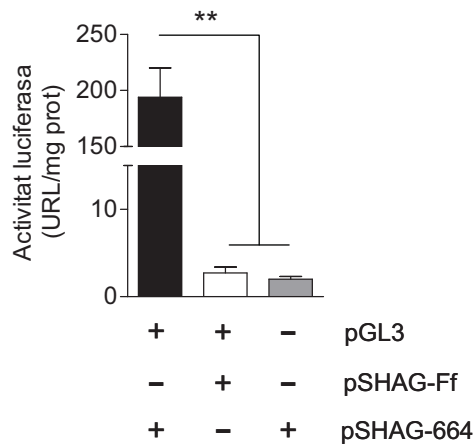


**Figura 29. Injecció hidrodinàmica a través de la vena cauda i detall de l'epiteli hepàtic fenestrat.**

Comparat amb altres mètodes no virals, el mètode de transferència gènica hidrodinàmica resulta molt atractiu en termes d'eficiència, reproduïbilitat i simplicitat (214). No obstant, l'aplicabilitat d'aquest mètode a la clínica humana presenta moltes dificultats, principalment l'escalabilitat dels volums a injectar. Les aplicacions més destacables de la transferència gènica hidrodinàmica inclouen, sobretot, l'avaluació del potencial terapèutic de determinats gens *in vivo*, (especialment proteïnes de secreció, convertint el fetge en una plataforma productora de la potencial proteïna terapèutica), l'estudi de nous vectors i elements de transferència gènica, així com l'ús de la metodologia per a l'estudi de la transferència d'elements no plasmídics, entre els que s'inclouen els siRNA i els vectors de shRNA, que ja ha estat aplicada a models murins amb finalitats terapèutiques (203; 215).

En tots els experiments *in vivo* d'aquest capítol les injeccions dels plasmidis es fan per injecció hidrodinàmica, seguint el protocol detallat a la secció de Material i Mètodes.

Inicialment, es va testar la funcionalitat del promotor U6 humà per a transcriure els shRNA in vivo en un sistema murí i, en definitiva, la capacitat de les construccions de shRNA per a silenciar una diana exògena al fetge. Per a assolir aquest objectiu es va co-injectar un vector d'expressió de la luciferasa de *Photinus pyralis* (pGL3) juntament amb els pSHAG. L'activitat luciferasa detectada es va reduir en un 98% en els fetges dels animals tractats amb pSHAG-Ff en comparació amb els tractats amb el pGL3 sol o conjuntament amb el shRNA no específic per la luciferasa (Figura 30). En canvi, en altres teixits, com el ronyó, no es va detectar activitat luciferasa en cap condició. Aquest experiment, demostrà, un cop més, l'especificitat de de les seqüències envers la diana silenciada i la idoneïtat del tàndem transfecció hidrodinàmica- vectors pSHAG per al silenciament in vivo d'una diana de forma específica al fetge, validant el sistema experimental que s'aplicarà en els experiments següents.

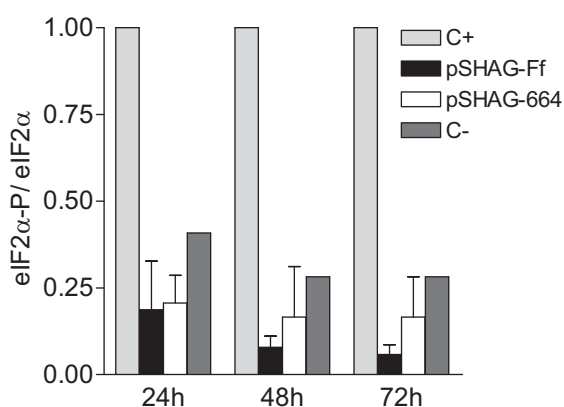


**Figura 30. La transferència gènica hidrodinàmica de vectors d'expressió de shRNA facilita la interferència d'RNA exogen a fetge.** Es va injectar a la vena de la cua de ratolins diabètics (ICR (CD1) STZ+) 10 µg de pGL3 amb o sense un shRNA específic (pSHAG-Ff) o inespecífic (pSHAG-664) per la luciferasa en una proporció 1:6. Setanta-dues hores després es va fer un assaig d'activitat luciferasa en extractes de fetge. Les dades representen les mitges ± ES, n=3; \*\* p< 0.01; test t de Student.

### **Toxicitat induïda per la injecció hidrodinàmica i/o els shRNA**

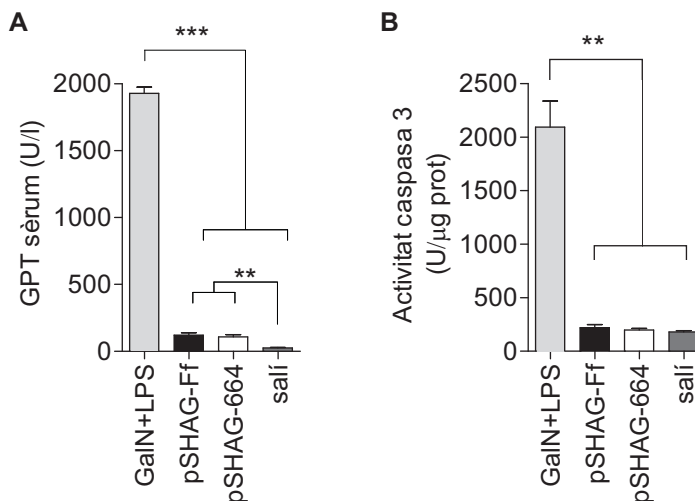
En cèl·lules de mamífer, el RNA de doble cadena de longitud superior a 30 nucleòtids induïx una resposta a estrès, activant la via de PKR/interferó/RNAsaL, que desemboca en un bloqueig inespecífic de la síntesi de proteïnes, degradació del RNA i mort cel·lular per apoptosi. Malgrat tot, s'ha descrit que determinades seqüències de siRNA sintètics, així com de vectors de shRNA poden, en alguns casos, activar aquestes vies in vitro (159; 160) i, fins i tot, induir mortalitat in vivo (164). La

causa d'aquest efecte tòxic no ha estat ben determinada, però sembla que hi estan implicats els Toll like receptors (TLR). Recentment s'ha trobat una correlació entre la presència de motius 5'UGGC3', i toxicitat cel·lular, especialment quan aquest motius es troben a la cadena guia del siRNA (163). Les seqüències de shRNA Ff i 482 emprades en el present treball contenen el motiu 5'UGGC3' a la cadena acompanyant (Ff) i a ambdues cadenes (482), respectivament. Vam voler descartar un possible efecte tòxic induït per les seqüències de shRNA in vivo. Els ratolins van ser injectats mitjançant la tècnica hidrodinàmica amb una dosi alta (100µg) dels vectors pSHAG i, a continuació, es van analitzar: a) l'activació de la via de PKR mesurant els nivells de fosforilació d'eIF2 $\alpha$  en fetge (eIF2 $\alpha$ -P/eIF2 $\alpha$  total) (159), b) l'activació de la via d'IFN $\alpha$  (216), mesurant els nivells d'IL-12 en sang i c) la inducció d'apoptosi al fetge, mesurant l'activitat caspasa 3 en extractes hepàtics. Tal i com s'il·lustra a la figura 31, la injecció de poli-dl:dC sintètic (C+) induïx entre 3 i 26 vegades la fosforilació d'eIF2 $\alpha$ , comparat amb els tractaments control salí (C-). En canvi, la injecció dels vectors pSHAG-Ff i pSHAG-664 no induï en cap cas la fosforilació d'eIF2 $\alpha$ . D'altra banda, no es van trobar alteracions associades a l'expressió dels shRNA en els nivells de IL-12 circulants (dada no mostrada), descartant l'activació de la via d'interferó. A més, tal i com il·lustra la figura 32, en cap cas es va trobar activitat caspasa 3 per sobre dels nivells basals.



**Figura 31. La via de PKR no s'activa en resposta al tractament amb pSHAG in vivo.** Ratolins diabètics (ICR (CD1) STZ+) van ser injectats amb una dosi alta (100 µg) de cada un dels pSHAGs mitjançant la injecció hidrodinàmica. Com a control positiu de la inducció de la via de PKR (C+) es va injectar els ratolins amb 50 µg de poli dl:dC, un anàleg de RNA de doble cadena, intraperitonealment. El grup control negatiu (C-) el conformen ratolins injectats amb salí fisiològic intraperitonealment. A les 24, 48 i 72 hores després dels respectius tractaments el contingut hepàtic de eIF2 $\alpha$  i P-eIF2 $\alpha$  va ser analitzat per Western blot i quantificat per densitometria. L'activació d'eIF2 $\alpha$  es valora com a la relació entre la forma fosforilada i la total. Les dades es presenten com l'activació d'eIF2 $\alpha$  en relació al control positiu, (n=5).

La transferència gènica hidrodinàmica també indueix dany hepàtic, que es reflexa en un pic de transaminases en sèrum, que torna als nivells basals entre 48 i 72 hores post-injecció (210). Els estudis mecanístics publicats envers a la injecció hidrodinàmica s'han realitzat sempre en animals sans, però no s'ha avaluat el grau de dany hepàtic que comporta la injecció hidrodinàmica en animals diabètics. Per tant, es va controlar, d'una banda, els nivells de transaminases en sèrum (GPT) com a indicador de necrosi, de l'altra, l'activació de caspasa 3 en extractes de fetge, com a indicador d'apoptosi, a diferents temps post-injecció. Els nivells de GPT en els animals injectats amb els pSHAGs amb la injecció hidrodinàmica era significativament superior 48 hores després de la injecció comparat amb els ratolins injectats amb salí fisiològic intraperitonealment, però molt considerablement per sota del dany hepàtic causat per una agressió amb galactosamina més LPS (Figura 32). Tot i que els nivells de transaminases sèriques es troben relativament elevats entre les 24 i 48 hores després de la injecció hidrodinàmica, aquests tornen a la normalitat 72 hores després (Taules 8 i 10). A més, en cap cas es va trobar activitat caspasa 3 per sobre del control negatiu (injecció intraperitoneal de salí fisiològic). Tampoc es va detectar diferències en els nivells de GPT ni en l'activitat caspasa 3 entre els dos grups de tractament (Ff i 664), descartant així un possible efecte inespecífic secundari al dany hepàtic associat la seqüència nucleotídica dels shRNA.

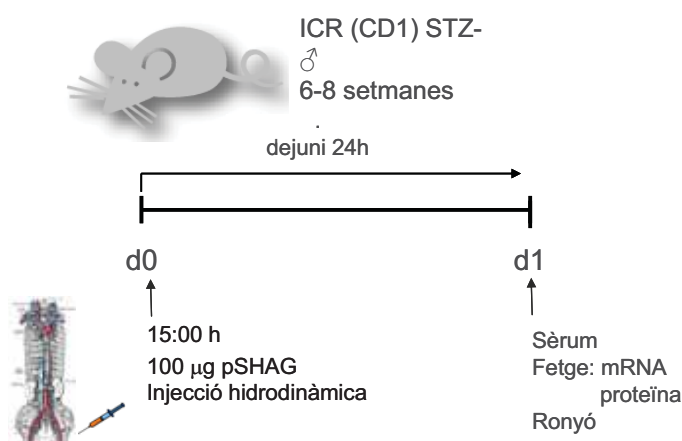


**Figura 32. La injecció hidrodinàmica de vectors de shRNA no indueix apoptosi al fetge però sí una lleu necrosi transitòria.** L'activitat caspasa 3 en fetge i els nivells de GPT en sèrum 48 hores després de la injecció hidrodinàmica en ratolins ICR (CD1) STZ+ amb 100 μg de vectors pSHAG. El grup control positiu de dany hepàtic (C+) consta de ratolins ICR (CD1) sans injectats i.p. amb 700 mg/kg galactosamina i 100 mg/kg LPS en un volum de 200 μl de salí fisiològic. El grup control negatiu (C-) són ratolins ICR (CD1) injectats i.p. amb 200 μl de salí fisiològic. Les dades es mostren com a les mitges ± ES, n= 3-8, \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; test t de Student

En conjunt, les dades indiquen que la injecció hidrodinàmica dels vectors pSHAG-Ff i pSHAG-664 no activen les vies inespecífiques de bloqueig de la transcripció mediades per PKR/Interferó associades a la seqüència del shRNA, així com tampoc indueixen cap mena de toxicitat o dany hepàtic que derivi en necrosi sostinguda o apoptosi al fetge associat al mètode de transferència gènica.

### Silenciament específic de PEPCK-C endògena en animals sans

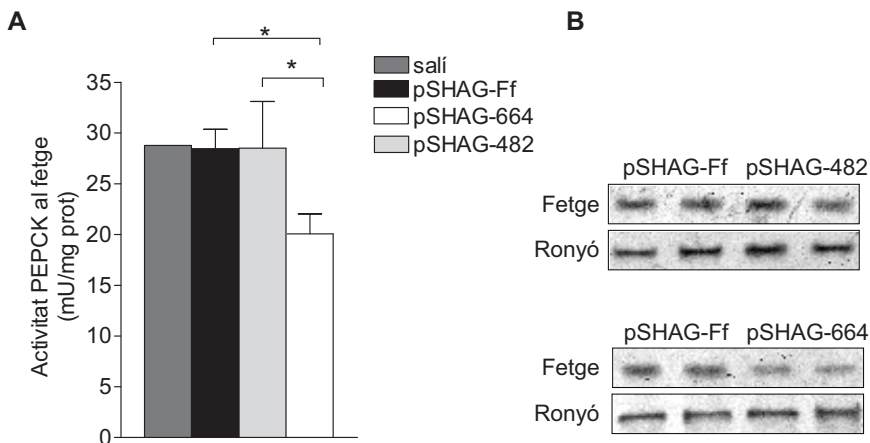
Seguidament, es va testar la capacitat de les seqüències 482 i 664 per a silenciar la PEPCK-C endògena in vivo. Com a primera aproximació es van emprar ratolins sans de la soca ICR (CD1). La figura 33 il·lustra el protocol que es va seguir



**Figura 33. Protocol experimental de silenciament de PEPCK-C hepàtica en ratolins sans.**

La transferència gènica hidrodinàmica, a més del fetge (òrgan diana majoritari de la tècnica), abasteix de forma minoritària altres teixits, entre els que s'inclou el ronyó (209). Tenint en comte que PEPCK-C s'expressa a ronyó, on exerceix un important paper fisiològic en la gluconeogènesi vam voler corroborar que la injecció hidrodinàmica de vectors de shRNA promou silenciament de PEPCK-C de forma exclusiva a fetge. La injecció hidrodinàmica de pSHAG-664 aconseguí una reducció apreciable en el contingut de proteïna al fetge, però no al ronyó. Aquesta disminució en el contingut proteic de l'enzim es reflexà en una reducció d'un 30% en l'activitat enzimàtica PEPCK al fetge ( $20.1 \pm 2.0$  vs  $28.5 \pm 1.9$  mU/mg de proteïna;  $n=4$ ;  $p<0.05$ ; test t de Student), però no al ronyó. Contràriament, als ratolins injectats amb pSHAG-482 el contingut de PEPCK-C no va disminuir ni al fetge ni al ronyó (Figura 34), corroborant la ineficàcia en la silenciament de la diana endògena in vivo que els

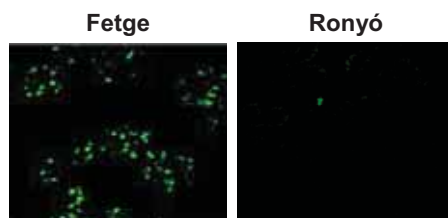
experiments in vitro suggerien. En aquest punt, es va seleccionar per a continuar l'estudi la seqüència 664 ja que, tant in vitro com in vivo resulta més eficient que la seqüència 482, sense comportar mortalitat ni cap efecte tòxic apreciable sobre el fetge ni l'estat general dels animals associat a la seqüència de shRNA.



**Figura 34. Avaluació de l'eficiència de silenciament de les seqüències de shRNA 482 i 664 sobre la PEPCK-C endògena en fetge i ronyó.** 24 hores després de la injecció hidrodinàmica amb 100 µg de pSHAG els animals, dejunats des del moment de la injecció, van ser sacrificats. **A.** L'activitat enzimàtica PEPCK es va assajar en extractes hepàtics i es va normalitzar pel contingut proteic de l'extracte. Les dades són mitges ± ES; n=4; \*p<0.05; test t de Student. **B.** El contingut de PEPCK-C en fetge i ronyó després dels tractaments es va valorar per Western Blot.

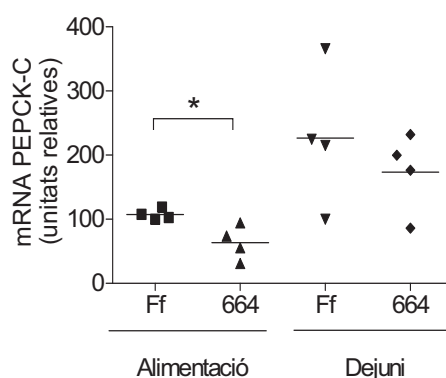
A continuació, es va contrastar el patró d'activitat silenciadora obtingut amb el patró d'expressió resultant de la tècnica hidrodinàmica en el nostre sistema experimental, utilitzant un vector codificant per a la proteïna verda fluorescent (GFP) (Figura 35). La visualització per microscopia de fluorescència de la proteïna verda fluorescent mostra que al fetge hi ha una població d'hepatòcits que expressen GFP. L'eficiència parcial de transfecció al fetge obtinguda en el nostre model és comparable amb els resultats mostrats a la bibliografia (196; 209; 214) i correlaciona amb una eficiència parcial de silenciament de PEPCK-C, tal i com s'ha descrit en els paràgrafs anteriors. Contràriament, al ronyó no s'aprecia una població cel·lular amb una fluorescència significativa per sobre del fons, sinó que les cèl·lules positives per GFP es troben aïllades i de forma esporàdica, indicatiu de la incapacitat de la metodologia de transduïr les cèl·lules renals i coherent amb l'absència de silenciament de PEPCK-C en ronyó.





**Figura 35. Patró d'expressió de GFP emprant la injecció hidrodinàmica.** Ratolins ICR (CD1) van ser injectats amb 100 µg de pEGFP i perfundits amb una solució de 4% PFA 48 hores després. La figura mostra la visualització directa de GFP (verd) sobre les seccions de fetge de 50 µm, per microscopia de fluorescència.

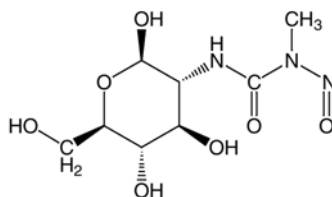
PEPCK-C es regula exclusivament a nivell transcripcional a través de l'eix insulina/glucagó. En un animal sa els nivells de mRNA són mínims en alimentació i màxims en dejú (70). Per a discernir possibles diferències en la capacitat de silenciament en funció de l'estat nutricional i valorar de forma directa el poder de silenciament dels shRNA sobre la seva diana endògena, es va valorar el contingut de mRNA en animals alimentats i dejunats en resposta a pSHAG-664. La reducció del mRNA, tot i que no significativa, era d'un 20% en animals dejunats. En canvi, en animals alimentats, es va trobar una reducció significativa del 40% del mRNA (Figura 36).



**Figura 36. Silenciament de pSHAG-664 sobre el mRNA de PEPCK-C.** Els ratolins ICR (CD1) es van injectar amb 100 µg de pSHAG-664 o pSHAG-Ff segons el mètode hidrodinàmic. La capacitat de silenciament es va mesurar 24 hores després en estat d'alimentació o dejuni. El mRNA hepàtic es va analitzar per Northern blot. Les membranes es van normalitzar amb GAPDH. El resultat s'expressa com la relació entre el mRNA de PEPCK-C i el mRNA de GAPDH. Els valors representen les mitges ± ES; n=4, \* p<0.05; test t de Student.

## Silenciament de PEPCK en el fetge de ratolins diabètics

Per tal d'investigar si la inhibició de la PEPCK-C hepàtica podria ser una estratègia vàlida per a reduir la gluconeogènesi i la glucèmia post-absortiva, es van traslladar els experiments a un model de ratolí amb diabetis experimental induïda amb estresptozotocina (STZ). Aquest model de ratolí amb es caracteritza per una disminució, gairebé total, dels nivells d'insulina, una hiperglucèmia severa i alteracions de la transducció de senyals dependents d'insulina. La STZ ([2-deoxi-2(3-metil-nitrosurea)-1-D-glucopiranos] és una antibiòtic d'ampli espectre produït per *Streptomyces achromogenes*. que té un potent efecte tòxic sobre la cèl·lula beta pancreàtica, a la qual entra a través del transportador de glucosa Glut2 gràcies a la seva similitud estructural amb la glucosa (Figura 37). S'han proposat diferents mecanismes de toxicitat de la STZ a la cèl·lula beta: 1) metilació del DNA, 2) generació de radicals lliures i 3) producció d'òxid nítric, que desemboquen en mort cel·lular per apoptosi (217).

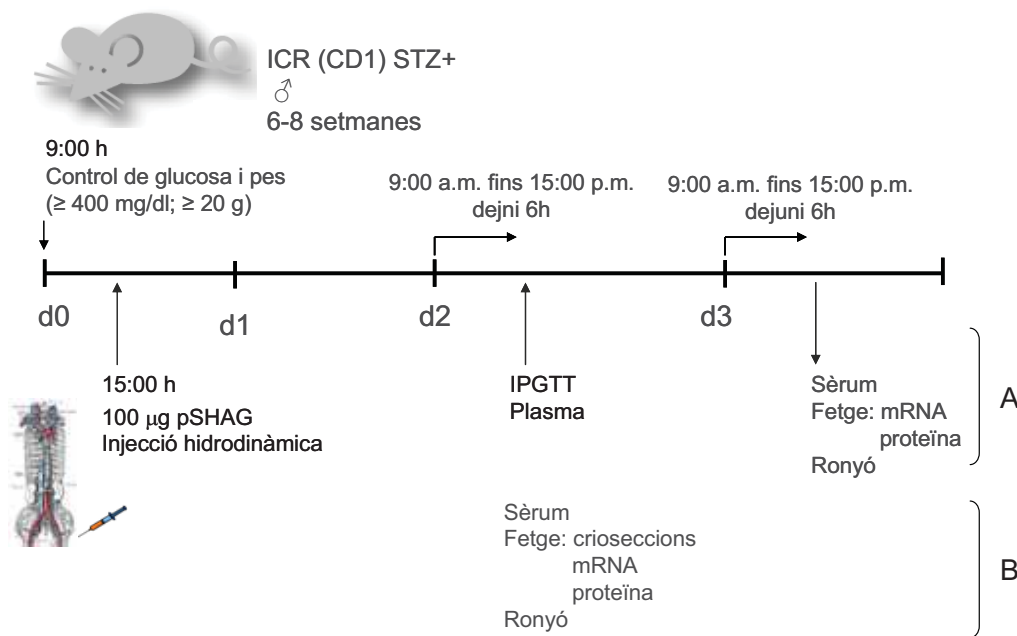


**Figura 37. Estructura química de la STZ**

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

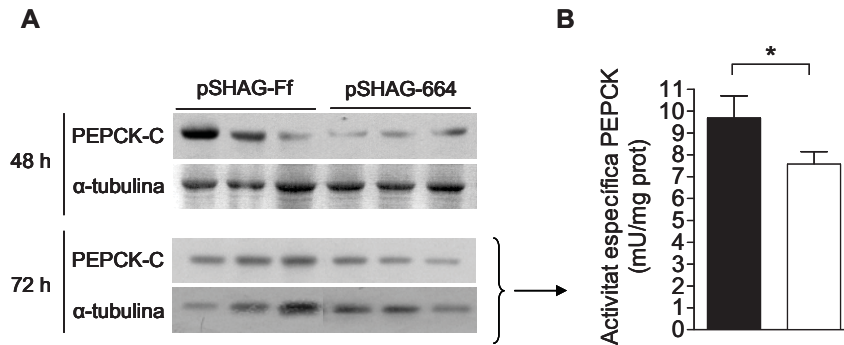
- Una única administració intraperitoneal de STZ a dosis elevades (> 160 mg/kg) resulta en una ràpida destrucció de les cèl·lules beta pancreàtiques, amb una pèrdua de més del 90% de la secreció d'insulina, que desemboca en l'aparició d'hiperglucèmia en un període curt de temps (<7 dies).
- Quan la STZ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

destrueix, desembocant en una diabetis severa en un període més llarg de temps (vàries setmanes, depenent de la soca emprada).



**Figura 38. Protocol experimental de silenciament de PEPCK-C hepàtica en ratolins diabètics tipus I.**  
A: Sacrifici a les 72 hores post-injecció. B: Sacrifici a les 48 hores post-injecció.

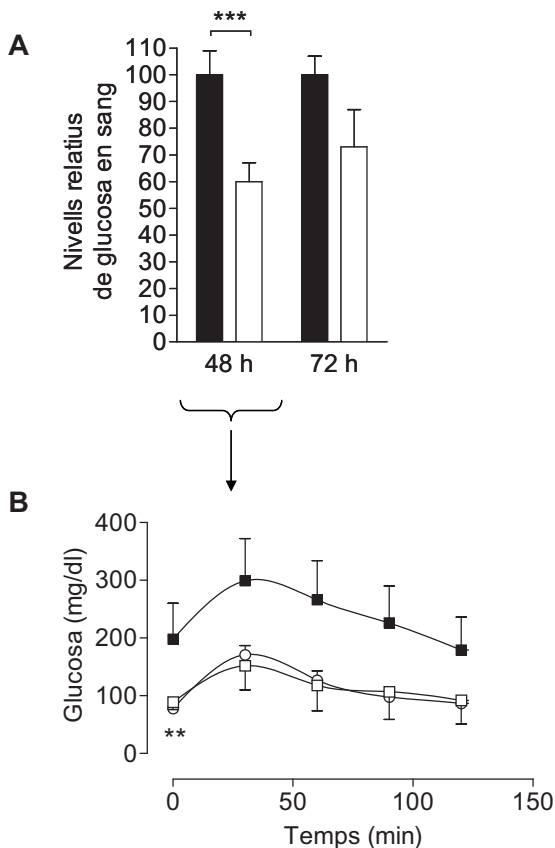
En el present treball es va aplicar el protocol d'administració única a dosis elevades tal i com es descriu a l'apartat Material i Mètodes. En el moment de la injecció hidrodinàmica els animals tenien una glucèmia superior a 400 mg/dl després d'un dejuni curt de 6 hores i pesaven entre 20 i 25 grams. Només aquells animals que mantenien el seu pes per sobre dels 20 grams durant el desenvolupament de la diabetis eren mantinguts, a fi d'evitar possibles interferències per una possible caquèxia induïda per l'absència d'insulina. Com a control positiu d'inhibició sistèmica de l'activitat PEPCK-C es va fer servir l'àcid 3-mercaptocolínic (3-MPA), inhibidor no competitiu de la PEPCK-C (200). Els ratolins es van injectar amb 100 µg de pSHAG-Ff o pSHAG-664. Passades 48 hores o 72 hores (Figura 38), els animals varen ser sotmesos a un període curt de dejuni (6 hores) abans d'analitzar els pesos i les glucèmies, eutanasiar-los i extreure'n sang i teixits.



**Figura 39. Silenciament de PEPCK-C en fetges de ratolins amb diabetis experimental induïda per STZ.** Ratolins ICR (CD1) STZ<sup>+</sup> va ser injectats amb 100  $\mu$ g de pSHAG-Ff (barra negra) o pSHAG-664 (barra blanca). **A.** Passades 48 o 72 hores, els animals van ser sacrificats. Es van obtenir extractes hepàtics i el contingut de PEPCK-C en aquests extractes es va analitzar per Western blot. Es mostren fotos representatives d'almenys tres experiments independents. **B.** L'activitat enzimàtica es va analitzar en els extractes obtinguts 72 hores post-injecció i es va normalitzar pel contingut proteic dels mateixos, expressant-la com a activitat específica. Les dades són les mitges  $\pm$  ES (n=7-9; \* p<0.05; test t de Student).

L'anàlisi per Western Blot del contingut de proteïna PEPCK-C als fetges dels animals va revelar una silenciament parcial i transitòria (Figura 39 A). La quantificació densitomètrica d'aquestes membranes mostrà una reducció aproximada del 50% en els nivells de PEPCK 48 hores post-tractament, mentre que l'eficàcia del silenciament a les 72 hores quedà reduïda al 40%. En concordància, l'activitat enzimàtica PEPCK a les 72 hores després de la injecció hidrodinàmica és un 20% inferior en resposta al tractament amb pSHAG-664 ( $7.6 \pm 0.6$  vs  $9.7 \pm 1.1$  mU/mg de proteïna; n=7 i n=9; p<0.05), tal i com es mostra a la figura 39 B.

Aquesta reducció parcial en l'activitat PEPCK-C hepàtica es va reflexar consistentment en la glucèmia. Els animals tractats amb pSHAG-664 van patir una disminució de les glucèmies tant a les 48 com a les 72 hores post-injecció. En correlació amb l'activitat enzimàtica i el contingut de PEPCK a fetge, la reducció de la glucèmia mostrà també un patró de transitorietat (Figura 40). L'efecte hipoglucemiant va resultar molt més significatiu i evident a les 48 hores, moment en que la reducció de la glucèmia era d'un 40% ( $218 \pm 26$  vs  $364 \pm 33$  mg/dl, n=26 i n= 25 p<0.001). En aquest punt, l'efecte hipoglucemiant de la silenciament parcial de PEPCK-C hepàtica es comparable amb el s'obté amb el tractament sistèmic amb 3-MPA ( $149 \pm 30$  mg/dl; n=3). En canvi, a les 72 hores post-injecció la reducció dels nivells de glucèmia en dejú minvà al 25% ( $350 \pm 68$  vs  $476 \pm 35$  mg/dl; n=10 i n=12; p=0.05). En cap dels animals tractats es va observar hipoglucèmia.



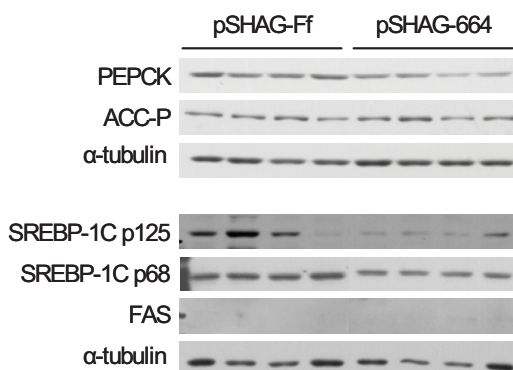
**Figura 40. Efecte de la modulació de l'activitat PEPCK-C hepàtica sobre l'homeòstasi de la glucosa en ratolins amb diabetis experimental induïda per STZ (ICR (CD1) STZ+).** **A.** L'efecte sobre la glucèmia en dejú a les 48 i 72 hores després d'haver injectat els ratolins amb els vectors pSHAG. Els resultats són expressats com a glucèmies relatives del tractament amb el shRNA per PEPCK-C vs el control (48 hores: pSHAG-Ff, n=25 i pSHAG-664, n=26, \*\*\* p<0.001; 72 hores: pSHAG-Ff, n=12 i pSHAG-664; p=0.05). **B.** Test de tolerància a la glucosa. Un bolus de glucosa de 1 mg/g es va injectar intraperitonealment als animals prèviament dejunats. La glucèmia es va controlar en el període de temps indicat en els grups experimentals de ratolins diabètics ICR (CD1) STZ+ pSHAG-Ff (■), pSHAG-664 (□) i en ratolins sans ICR (CD1) STZ- (○). Els valors representen la mitja ± ES (n=5; \*\* p<0.01).

L'efecte positiu sobre el control de la glucèmia ens va empènyer a analitzar més en profunditat l'homeòstasi de la glucosa en aquests animals. Es va realitzar un test de tolerància oral a la glucosa 48 hores després del tractament (Figura 40 B). En el moment d'iniciació de l'assaig els nivells de glucosa en sang en dejuni era un 40% inferior en els animals tractats amb pSHAG-664 respecte del tractats amb pSHAG-Ff ( $111 \pm 30$  vs  $272 \pm 47$  mg/dl;  $p < 0.01$ ;  $n=5$ ). La silenciació parcial de PEPCK-C hepàtica exercí un potent efecte sobre la tolerància a la glucosa: els ratolins injectats amb pSHAG-664 mostraven una corba pràcticament normalitzada. La fase inicial de la corba de tolerància (minut 0 fins a minut 30) evoluciona en paral·lel a tots els grups experimentals analitzats, indicant que l'absorció i utilització de glucosa al fetge no es veu afectada en resposta al tractament amb pSHAG-664 respecte del tractament control. D'altra banda, la reducció dels nivells de glucogen romanent als fetges d'aquests animals indica que la síntesi indirecta de glucogen podria estar afectada per la inhibició de la gluconeogènesi secundària a la menor activitat PEPCK-C hepàtica. Un cop més, l'efecte té una tendència transitòria, essent significatiu en ambdós temps d'anàlisi, però amb de

menor impacte a les 72 hores (Taula 11). Per tant, podem concloure que l'efecte hipoglucemiant de la silenciació de PEPCK-C no es deu a un increment de la metabolització de glucosa en fetge, sinó més aviat a una reducció de la gluconeogènesi hepàtica i que aquest efecte sobre l'homeòstasi de la glucosa és independent dels efectes directes o indirectes de la insulina, ja que els nivells residuals de la hormona són negligibles després de la injecció d'estreptozotocina (Taula 10).

Aquests conjunt de dades suggereixen que: a) l'activitat PEPCK-C exerceix un control directe sobre la glucèmia en dejú a través del control del flux de la gluconeogènesi; i b) la injecció hidrodinàmica de vectors plasmídics implica una pèrdua progressiva de l'expressió dels shRNA, en correlació amb el que s'ha observat en altres estudis (213; 214).

En vista dels evidents canvis en l'homeòstasi de la glucosa, ens vam interessar també pel metabolisme lipídic (Taula 10). La concentració de triglicèrids (TAG) i àcids grassos lliures (AGL) presents en sèrum es reduí significativament als animals amb la PEPCK-C hepàtica parcialment silenciada. Les diferències en el metabòlits sèrics també es van mostrar transitòries, en correlació amb l'efecte de silenciament descrit. Acompanyant a la reducció en els nivells d'AGL, es va observar una tendència no significativa a augmentar en els nivells de  $\beta$ -hidroxibutirat ( $\beta$ -HBA).



**Figura 41. Efectes de la silenciació parcial de PEPCK-C sobre la lipogènesi als fetges de ratolins amb diabetis experimental induïda per STZ.** Els nivells d'algunes proteïnes implicades en la regulació del metabolisme energètic van ser analitzades per Western blot realitzats sobre fetges de ratolins en dejuni que havien rebut una dosi de 100  $\mu$ g de pSHAG-Ff o pSHAG-664 dos dies abans. Es mostren blots representatius d'experiments independents

Per tal d'aprofundir en els mecanismes de regulació involucrats en els canvis metabòlics observats, es va analitzar el contingut hepàtic d'alguns enzims i proteïnes reguladores implicats en la lipogènesi

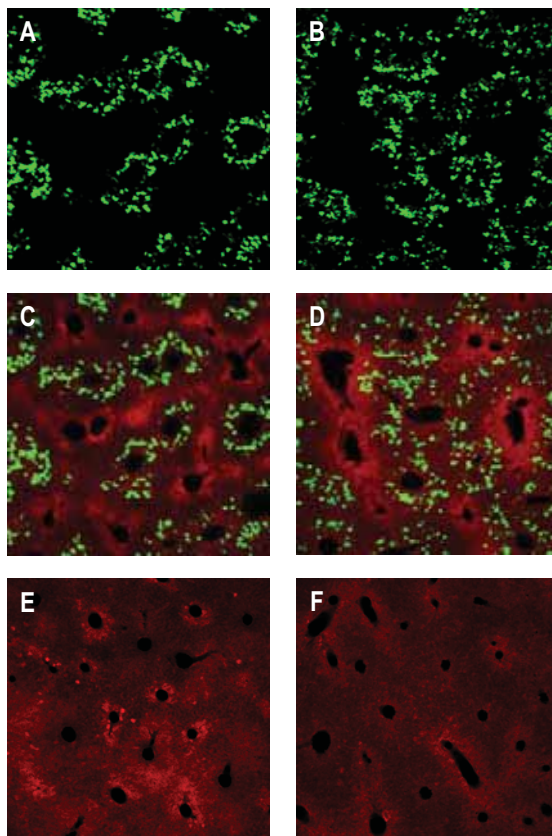
(FAS i SREBP-1c) i en la  $\beta$ -oxidació lipídica (ACC-P) (Figura 41). El silenciament de PEPCK-C al fetge s'acompanyà, segons l'anàlisi densitomètric de les membranes, d'una caiguda dels nivells de SREBP-1c, en un 82% i 38% de la forma precursora (p125) i la madura (p68), respectivament. En canvi, els nivells de FAS i de la forma fosforilada d'ACC (inactiva) romangueren estables. Aquest patró d'expressió dels enzims lipogènics és coherent amb la manca d'acumulació de lípids als fetges del grup AdU6-664 (Taula 11) i suggereix que no hi ha una inducció de lipogènesi en resposta a la silenciament de PEPCK-C al fetge.

### **Immunolocalització de PEPCK-C després de la injecció hidrodinàmica dels vectors pSHAG**

Els resultats mostrats fins al moment ens feien palès que la metodologia emprada no permetia obtenir un silenciament total de PEPCK-C en fetge, fins i tot a les altes dosis de transfecció que estàvem utilitzant. Per constatar els límits en l'eficiència de silenciament en funció de l'eficiència i l'abast del mètode de transducció utilitzat, vam comprovar la distribució i abundància de les cèl·lules hepàtiques transduïdes amb el mètode de la transferència gènica hidrodinàmica en relació amb la localització zonal de la PEPCK-C al parènquima hepàtic. Per a això vam injectar els ratolins amb diferents quantitats d'un plasmidi d'expressió de GFP (pEGFP) o pSHAGs i vam visualitzar GFP de forma directa i PEPCK-C per immunohistoquímica en seccions de fetge.

La quantitat de cèl·lules positives per GFP incrementa amb la dosi (Figura 42 A i B). Altres autors han demostrat fins a un 40% d'hepatòcits transfectats amb altes dosis de plasmidi injectat hidrodinàmicament (209; 218), però la distribució zonal del transgen no ha estat descrita fins ara. Aquest factor és crucial en el context de la silenciament de un enzim com la PEPCK-C, amb una clara distribució zonal en el lòbul hepàtic decreixent al llarg de l'eix porto-central (Figura 12) (63). En consonància amb el que està descrit per a aquest enzim, a les seccions dels fetges dels animals diabètics, la immunolocalització de PEPCK és extensiva al llarg de tot l'eix, en un gradient d'intensitat, amb una clara compartimentalització a la zona periportal, tal i com reflexa la fluorescència vermella a la figura 42. Contràriament, els hepatòcits positius per a GFP van resultar ser els de menor intensitat en el gradient de PEPCK-C (corresponents a la zona perivenosa-intermèdia), però mostraven una distribució més àmplia a major dosi de plasmidi injectat (Figura 42 C i D). D'aquests resultats hom pot inferir que la distribució relativa al lòbul hepàtic de PEPCK-C respecte de l'expressió del transgen emprant la transferència gènica hidrodinàmica pot ser una explicació per a l'efecte parcial en la silenciament de PEPCK-C descrita en aquest capítol. No obstant,

és important tenir en compte que, als fetges tractats amb 100 µg de pSHAG-664 mitjançant la injecció hidrodinàmica, la senyal de PEPCK-C redueix la seva intensitat tant a la zona perivenosa-intermèdia com a la zona periportal, indicatiu d'un efecte de silenciament global a tot el lòbul hepàtic (Figura 42 E i F).



**Figura 42. Expressió zonal al parènquima hepàtic i silenciament parcial de PEPCK-C obtingut amb la injecció hidrodinàmica.** Els ratolins ICR (CD1) STZ+ van ser injectats amb 10 o 20 µg de pEGFP (panells A fins a D) o 100 µg de pSHAG-Ff (panell E) o pSHAG-664 (panell F) i perfundits amb una solució de 4% PFA 48 hores després. La figura mostra la visualització directa de GFP (verd) i la immunodetecció de PEPCK-C (vermell) sobre seccions de fetge de 50 µm, per microscopia confocal. Els panells A i B corresponen a camps representatius de la distribució hepàtica de GFP obtinguda amb la transferència gènica hidrodinàmica de dosis de 10 o 20 µg respectivament. La co-localització de la PEPCK-C endògena amb la GFP transfectada a les dosis indicades es mostren en els panells C (10 µg) i D (20 µg). Finalment, es mostren imatges representatives de la distribució de PEPCK-C 48 hores després de la injecció hidrodinàmica amb 100 µg de pSHAG-Ff (panell E) o pSHAG-664 (panell F). Les imatges són augmentades 200X.



**Taula 8. Panell metabòlic sanguini de ratolins ICR (CD1) STZ- tractats amb pSHAG mitjançant la transferència gènica hidrodinàmica.**

Ratolins sans van ser injectats amb 100 µg de pSHAG-664 pSHAG-Ff. Seguidament van ser sotmesos a dejuni durant les 24 hores posteriors i van ser sacrificats. Es van analitzar diferents metabòlits en sang i sèrum. Les dades són les mitges ± ES de 5 animals per grup.

	Sang					Sèrum				
	Glucosa (mg/dl)	TAG (mg/dl)	AGL (mmol/l)	Lactat (mg/dl)	Insulina (pg/ml)	GPT (U/l)	β-HBA (mmol/l)			
pSHAG-Ff	38 ± 6	70.0 ± 10.5	2.3 ± 0.2	117.5 ± 11,6	53.9 ± 20.3	329 ± 108	4.1 ± 0.4			
pSHAG-664	42 ± 3	83.3 ± 19.1	2.1 ± 0.3	105.6 ± 4,6	73.8 ± 9.6	215 ± 29	4.6 ± 0.64			

**Taula 9. Panell metabòlic hepàtic de ratolins ICR (CD1) STZ-tractats amb pSHAG mitjançant la transferència gènica hidrodinàmica.**

Ratolins sans van ser injectats amb 100 µg de pSHAG-664 pSHAG-Ff. Seguidament van ser sotmesos a dejuni durant les 24 hores posteriors i van ser sacrificats. Es van analitzar diferents metabòlits en fetge. Les dades són les mitges ± ES de 5 animals per grup. n.d., no determinat.

<b>Fetge</b>			
	<b>TAG</b> <b>(mg/g)</b>	<b>LDH</b> <b>(U/g)</b>	<b>Glicogen</b> <b>(mM/g)</b>
pSHAG-Ff	66.4 ± 9,3	n.d.	n.d.
pSHAG-664	60.3 ± 8,1	n.d.	n.d.

**Taula 10. Panell metabòlic sanguini dels ratolins ICR (CD1) STZ+ tractats pSHAG mitjançant la transferència gènica hidrodinàmica.**

Els ratolins van ser injectats amb 100 µg pSHAG-664 o pSHAG-Ff. Els animals van ser sotmesos a un dejuni de 6 hores abans del sacrifici, dut a terme als temps indicats. Diferents metabòlits de la sang i el sèrum van ser analitzats. Les dades que es presenten són les mitges ± ES d'entre 7 i 12 animals per grup obtingudes en, almenys, tres experiments independents. El valor de glucosa correspon a la mitja ± ES de 26 (pSHAG-Ff) i 25 (pSHAG 664) animals. Per la resta de valors les dades corresponen a la mitja ± ES d'entre 7 i 12 animals per grup obtingudes en almenys tres experiments independents. \*p< 0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; &p=0.05; test t de Student. n.d., no determinat.

		Sèrum						
Sang		Glucosa (mg/dl)	TAG (mg/dl)	β-HBA (mmol/l)	AGL (mmol/l)	Lactat (mg/dl)	Insulina (pg/ml)	GPT (U/l)
<b>48 h</b>	pSHAG-Ff	364 ± 33	102.5 ± 15.8	0.25 ± 0.08	1.44 ± 0.11	73.6 ± 7.9	11.3 ± 5.6	112 ± 16
	pSHAG-664	218 ± 26 ***	64.8 ± 11.4**	0.38 ± 0.14	0.89 ± 0.10***	63.4 ± 6.0	13.3 ± 0.5	142 ± 21
<b>72 h</b>	pSHAG-Ff	476 ± 35	83.8 ± 10.8	0.19 ± 0.015	1.1 ± 0.2	41.3 ± 6.4	n.d.	36.9 ± 6.4
	pSHAG-664	350 ± 68*	89.4 ± 14.1	0.24 ± 0.11	1.3 ± 0.4	44.2 ± 9.9	n.d.	47 ± 8.9

**Taula 11. Panell metabòlic hepàtic dels ratolins ICR (CD1) STZ+ tractats pSHAG mitjançant la transferència gènica hidrodinàmica.**

Els ratolins van ser injectats amb 100 µg pSHAG-664 o pSHAG-Ff. Els animals van ser sotmesos a un dejuni de 6 hores abans del sacrifici als temps indicats. Diferents metabòlits en sèrum i fetge van ser analitzats. Les dades que es presenten són les mitges ± ES d'entre 7 i 12 animals per grup obtingudes en, almenys, tres experiments independents. \*p< 0,05; \*\*p<0,01; test t de Student; n.d., no determinat

		<b>Fetge</b>		
		<b>TAG</b>	<b>LDH</b>	<b>Glicogen</b>
		<b>(mg/g)</b>	<b>(U/g)</b>	<b>(mM/g)</b>
<b>48 h</b>	pSHAG-Ff	12.7 ± 0.5	n.d.	43.9 ± 5.2
	pSHAG-664	13.1 ± 0.3	n.d.	12.7 ± 7.0**
<b>72 h</b>	pSHAG-Ff	13.3 ± 0.7	10.1 ± 0.0	49.9 ± 3.6
	pSHAG-664	11.2 ± 0.6	13.8 ± 0.0*	30.5 ± 8.0*

---

## DISCUSSIÓ

---

### **Transferència gènica hidrodinàmica de vectors de shRNA dirigits contra PEPCK-C**

En aquest primer bloc es demostra que els vectors de silenciament dirigits de forma específica al fetge mitjançant a la tècnica de transferència gènica hidrodinàmica proporcionen un model adequat per a avaluar: a) l'eficàcia de les seqüències de shRNA; i b) l'impacte metabòlic a curt termini de la reducció de l'activitat de la PEPCK-C.

L'efecte transitori de silenciament que s'obté en injectar vectors plasmídics nus d'expressió de shRNA mitjançant la injecció hidrodinàmica és inherent a la tècnica i ha estat descrita també per altres autors en estudis de de silenciació de gens exògens (214). Els resultats del present treball sobre un gen endogen confirmen la transitorietat d'aquest sistema. Tanmateix, no podem descartar, que la pèrdua dels efectes biològics sigui deguda a una retro-regulació encarregada de mantenir en estat d'equilibri la gluconeogènesi a través de l'estimulació de la transcripció de PEPCK-C.

La silenciació parcial de PEPCK-C obtinguda sembla correlacionar amb la biodistribució del DNA injectat amb aquesta tècnica. Tant els resultats aquí presentats com els resultats d'altres autors (209; 218) mostren que la tècnica de transferència gènica hidrodinàmica proporciona una eficiència de transfecció en fetge per sota del 50%. A més, en el cas de la silenciació d'una diana endògena com PEPCK-C amb una distribució heterogènea al fetge (219), la distribució relativa l'expressió del gen diana el plasmidi injectat pren especial importància. La localització zonal dels hepatòcits transduïts amb la tècnica de la injecció hidrodinàmica no ha estat descrita amb anterioritat a aquest treball. Els resultats obtinguts en aquest estudi mostren que l'expressió del transgen després de la injecció hidrodinàmica correspon a la zona perivenosa-intermèdia.

Els estudis en ratolins sans van demostrar una major capacitat per a silenciar PEPCK-C en animals alimentats, probablement en correlació amb l'increment de la taxa de transcripció de l'enzim que té lloc durant el dejuni (219). Per tant, un segon factor que pot comprometre la eficàcia de la silenciació a més de l'eficiència de transducció del vector emprat, és l'abundància del mRNA diana, malgrat el "reciclatge" de les molècules de siRNA inherent al seu mecanisme d'acció, tal i com altres estudis han suggerit (220).

### **Impacte de la reducció PEPCK-C sobre l'homeòstasi de la glucosa**

La genosupressió de PEPCK-C al fetge no té una repercussió en la glucèmia, ni en alimentació ni en dejuni, degut a efectes compensatoris diversos descrits a l'apartat introductori (93; 95-97). No obstant, quan després d'un dejuni perllongat, aquests ratolins són sotmesos a exercici físic, no són capaços de mantenir la glucèmia i desenvolupen hipoglucèmia poc temps després de l'inici de l'exercici (30 minuts) (95). Aquesta observació, és coherent amb que, en una situació en que els reservoris de glicogen han estat deplecionats prèviament pel dejuni, la gluconeogènesi hepàtica és la única font de glucosa i, sense aquesta, els animals esdevenen hipoglucèmics. Aquests estudis de genosupressió demostraren la dependència del flux gluconeogènic per PEPCK-C i la repercussió directa de l'activitat enzimàtica en la glucèmia en absència d'efectes compensatoris. En concordança, en el present estudi hem vist que la reducció parcial de l'activitat enzimàtica PEPCK-C hepàtica en ratolins sans no va acompanyada de canvis en la glucèmia. En canvi, en animals amb diabetis tipus I, la reducció parcial dels nivells de PEPCK-C al fetge comporta una reducció molt significativa dels nivells circulants de glucosa en dejuni i una tolerància a la glucosa normalitzada. De fet, en aquests animals, els nivells d'insulina sèrica residual després del tractament amb estreptozotocina és més de deu vegades inferior a la d'un animal sa, descartant així possibles efectes atribuïbles a secreció residual d'insulina o a l'estimulació de la secreció d'insulina secundària al tractament. Per tant, aquest model de ratolí diabètic, on no hi ha efectes indirectes atribuïbles a la senyalització de la insulina, ni al fetge ni als teixits perifèrics, la reducció de l'activitat PEPCK-C té un efecte directe sobre la glucèmia en dejú, reforçant la idea de la contribució de l'activitat PEPCK-C sobre la hiperglucèmia post-absortiva en diabetis.

### **Impacte de la reducció PEPCK-C sobre l'homeòstasi dels lípids**

La reducció de l'activitat PEPCK al fetge dels animals diabètic no només té conseqüències en el metabolisme glucídic, sinó que també al lipídic. El contingut de glicogen hepàtic i les concentracions de AGL i TAG en sèrum es redueixen, acompanyats d'una tendència a incrementar el cossos cetònics en sèrum. Les implicacions d'aquests canvis són diverses:

1. Una reducció en els dipòsits de glicogen al fetge poden estar indicant una reducció de la síntesi a partir de precursors gluconeogènics (síntesi de glicogen per la via indirecta), en concordança amb el descrit per al ratolí knock-out en fetge de PEPCK (95).

2. La reducció dels AGL en sèrum, acompanyat de la tendència a incrementar que mostren els cossos cetònics ( $\beta$ -HBA) l'absència d'acumulació de lípids al fetge en forma de triglicèrids, suggeriria una taxa de captació i  $\beta$ -oxidació d'AGL incrementada. Aquest fet, que contrasta amb el bloqueig de la  $\beta$ -oxidació i la lipidosi hepàtica descrita en el model de ratolí de gensupressió de PEPCK-C al fetge (93; 95-97), podria ser parcialment explicat si els nostres ratolins mantinguessin la taxa de consum d'oxigen (indicador indirecte del nivell de  $\beta$ -oxidació en un fetge gluconeogènic), tal i com prèviament s'ha descrita en un model d'inhibició transitòria de PEPCK-C amb l'inhibidor farmacològic àcid mercaptopicolínic en fetge de rata perfòs (200).

3. La reducció de les formes precursora (p125) i madura (p68) de SREBP-1c suggereix una reducció de la lipogènesi de novo. Tot i que transcripció de SREBP-1c és dependent de la insulina (221), en els ratolins injectats amb STZ a les dosis utilitzades en aquest estudi (que tenen nivells d'insulina negligibles) trobem expressió de SREBP-1c independent d'insulina. Anteriorment ja ha estat descrita l'expressió de SREBP-1c en resposta a carbohidrats de forma independent d'insulina en fetges de ratolins tractats amb STZ (222). Això indica que el metabolisme de la glucosa en els ratolins STZ<sup>+</sup> és suficientment actiu com per a mantenir cert nivell de captació de glucosa a l'hepatòcit, que en els animals on PEPCK-C està parcialment silenciada podria divergir de lipòlisi a glucòlisi, degut a la caiguda de SREBP-1c. Aquesta caiguda, tenint en compte que Matsuzaka et al. descriuen que els nivells circulants de glucosa poden regular positivament la transcripció de SREBP-1c en fetge, podria ser en resposta a la disminució de la hiperglucèmia.

Es podria especular, doncs, amb l'existència d'un mecanisme sensor de l'estat energètic cel·lular que estaria promovent la captació, activació i oxidació dels AGL, cosa que, en segon terme, provocaria la baixada dels nivells de SREBP-1c. Aquest, per la seva banda seria responsable de la inhibició de la síntesi i alliberament de TAG al fetge. A favor d'aquesta hipòtesi estaria el fet que la relació ACC-P/SREBP-1c en els fetges dels animals amb PEPCK-C silenciada és molt superior que en els animals controls, cosa que suggeriria a priori que el pool de AGL està sent derivat de síntesi cap a oxidació.





## **CAPÍTOL 2**

---

**Validació de PEPCK-C com a diana terapèutica: estudi de l'impacte metabòlic de la silenciació de PEPCK-C hepàtica en el context de la diabetis tipus II**

---



---

## INTRODUCCIÓ

---

Un cop constatada la contribució directa de la PEPCK-C hepàtica en la hiperglucèmia post-absortiva en diabetis i en la homeòstasi energètica ns vàrem plantejar estudiar els efectes, tant directes com indirectes, de la reducció del contingut de l'enzim al fetge sobre el metabolisme hepàtic en un model de resistència a insulina. La presència de la hormona i la resistència dels teixits perifèrics a aquesta ens haurien de permetre estudiar-ne els efectes sistèmics i el balanç d'algunes vies del metabolisme energètic que conflueixen al mitocondri.

No obstant, els estudis amb ratolins genosuprimits per a PEPCK-C hepàtica, publicats pels laboratoris del Dr. Mark Magnuson (94-97) i el Dr. Richard W. Hanson (93) en el decurs de la realització del treball experimental d'aquesta tesi doctoral, descriuen un fenotip que no es correspon amb una implicació de PEPCK-C hepàtica en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa, tot i que la gluconeogènesis queda abolida en absència de PEPCK-C al fetge d'aquests animals. Aquests estudis, qüestionen la relació directa ente l'activitat PEPCK-C i el control del flux de la via gluconeogènica, sugerrint una preponderància de l'enzim en el sosteniment del cicle de Krebs i la funció mitocondrial a través de la cataplerosi. Resulta essencial el fet que, tant el context fisiopatològic com l'abast de la supressió de l'activitat PEPCK-C al fetge divergeixen entre aquest model de ratolí genosuprimit i el model de diabetis experimental o genètica estudiats en el nostre laboratori.

Per això ens vam plantejar estudiar: a) les implicacions de la silenciació de PEPCK-C sobre l'homeòstasi de la glucosa i la resistència a la insulina en el marc de la patofisiologia de la diabetis b) la rellevància de la magnitud de la silenciació de PEPCK-C en fetge envers dels efectes sobre la cataplerosi i la funció mitocondrial, i c) les alteracions del metabolisme energètic resultants de la reducció de la gluconeogènesi hepàtica en el context de la resistència a la insulina. Aquests estudis ens han permès extreure importants conclusions sobre la implicació de PEPCK-C en el control de la gluconeogènesi i la glucèmia, validant idoneïtat de la PEPCK-C hepàtica com a diana una terapèutica plausible per la diabetis.

Per a desenvolupar aquests objectius vàrem utilitzar un model animal amb diabetis tipus II d'origen genètic, amb resistència perifèrica a insulina i disfunció sistèmica del metabolisme lipídic com són els ratolins de la soca C57BKS.Cg- +Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup>/Ola Hsd (db/db).

---

## RESULTATS

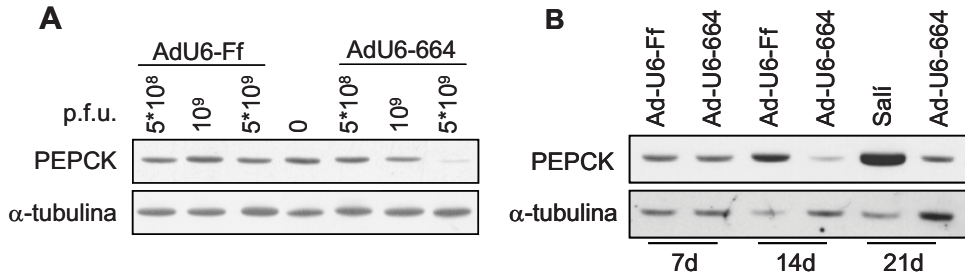
---

### **Silenciació gènica de PEPCK-C al fetge de ratolins diabètics C57BKS.Cg-+Lepr<sup>db/+</sup>Lepr<sup>db</sup> Ola Hsd (db/db) mediada per un vector adenoviral codificant per un shRNA específic**

Els ratolins db/db tenen una mutació espontània al gen del receptor de la leptina (Lepr<sup>db</sup>). Desenvolupen polifàgia, polidípsia i poliúria i obesitat a partir de les tres o quatre setmanes de vida. A més, manifesten hiperinsulinèmia a partir de les dues setmanes de vida i hiperglucèmia, resistència a la insulina i intolerància a la glucosa a partir de la quarta setmana de vida. Aquest pannel simptomatològic el fan un excel·lent model de diabetis tipus II. En el capítol anterior hem vist que la transferència gènica hidrodinàmica té algunes limitacions en termes d'abast i persistència de l'expressió del transgen. Per a obtenir una silenciació més potent i persistent en el temps, que permeti avaluar el paper de PEPCK-C en el desenvolupament de la diabetis, així com l'impacte d'una silenciació parcial vs una de total sobre el metabolisme energètic, es va optar per un vector que fos capaç d'arribar de forma homogènia a tot el fetge i mantingués per un període de temps més llarg l'expressió, en comparació amb la injecció hidrodinàmica, com ara els vectors adenovirals. Es van subclonar, doncs, els casets d'expressió dels shRNA Ff i 664 en vectors adenovirals del serotip 5, tal i com es descriu a l'apartat de Material i Mètodes.

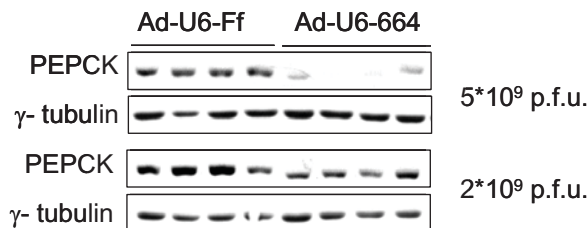
Els adenovirus són virus de DNA de doble cadena, sense embolcall, amb un genoma d'entre 26 i 45 kb capaços d'infectar i replicar-se tant en cèl·lules quiescents com replicatives. Entre els avantatges d'aquests virus es troben la facilitat en la producció a gran escala i l'eficiència en l'obtenció de partícules infectives. En infeccions sistèmiques, els adenovirus recombinants del serotip 5 són especialment eficients infectant el fetge (197). Als adenovirus recombinants basats en el serotipus 5, s'ha deleccionat una regió del genoma (E1 o E1-E3), fent-los deficients en la replicació i permetent la inserció de material genètic exogen. En models animals immunocompetents l'expressió de proteïnes virals a partir del genoma viral residual induïx una resposta immune citotòxica que neutralitza el virus, provocant la pèrdua d'expressió en algunes setmanes. Per tant, tot i que molt eficients en la infecció d'alguns teixits, la seva aplicació es limita a trasficcions transitòries amb una alta resposta immune, cosa que impossibilita un efecte terapèutic perllongat i/o la reinjecció del vector.

Es van realitzar experiments de dosi i temps-resposta (Figura 43). Aquests experiments van constatar la capacitat de l'adenovirus de reduir fins al 90% el contingut de PEPCK-C en el fetge dels ratolins db/db durant un període d'almenys dues setmanes.



**Figura 43. Assaig de dosi (A) i temps-resposta (B).** **A:** Ratolins db/db mascles de 6 setmanes d'edat i un pes mig de 32 grams van ser infectats amb les dosis indicades d'adenovirus recombinant. Una setmana després els animals van ser sacrificats en alimentació i el contingut de PEPCK-C en el fetge es va analitzar per Western Blot. **B:** Ratolins de les mateixes característiques van ser infectats amb la dosi més alta ( $5 \times 10^9$  p.f.u.) i el contingut de PEPCK-C en el fetge es va analitzar als 7, 14 i 21 dies després de la infecció.

Seguidament, es va constatar els nivells de proteïna PEPCK-C residuals en alimentació catorze dies després de la infecció amb dosis que anomenarem intermitja ( $2.5 \times 10^9$  p.f.u.) o alta (uns  $5 \times 10^9$  p.f.u.). En correlació amb els resultats preliminars mostrats a la figurs 43, la dosi intermitja proporciona una reducció parcial, mentre que la dosi alta proporciona una reducció quasi total del contingut de PEPCK-C en fetge (Figura 44).

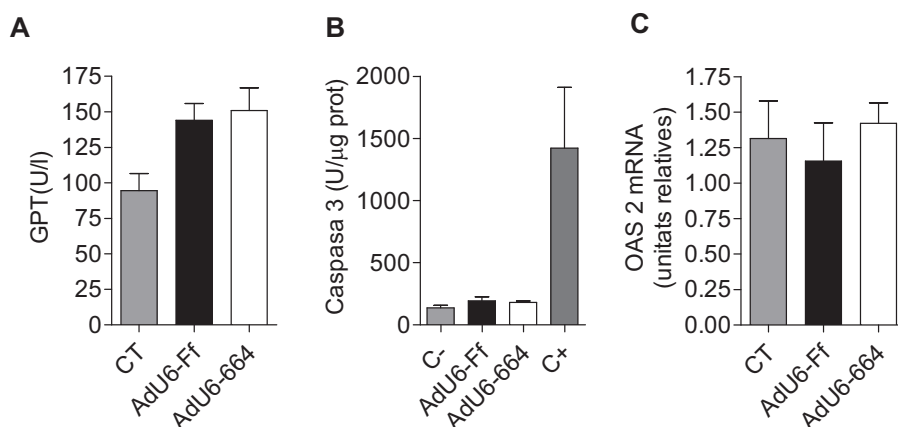


**Figura 44. Nivells de silenciament de PEPCK-C aconseguits amb diferents dosi d'adenovirus.** Catorze dies després de la infecció els ratolins db/db es van sacrificar en alimentació i els nivells de PEPCK-C es van analitzar per Western blot d'extractes totals de fetge.

### La transducció del fetge amb vectors adenovirals de shRNA no comporta toxicitat associada al vehicle ni a les seqüències de shRNA

Els vectors adenovirals utilitzats contenen una deleció parcial del seu genoma viral, però en mantenen una part i, en conseqüència, expressen proteïnes virals a la cèl·lula diana, que indueixen

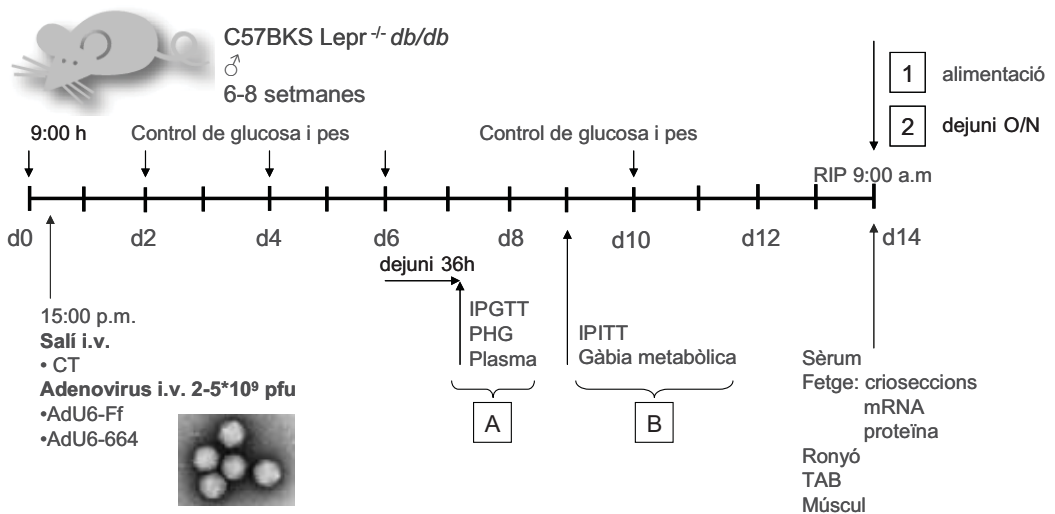
una certa resposta citotòxica. Per aquesta raó es va voler descartar possibles efectes deleteris secundaris a la infecció adenovírica. Es van analitzar, d'una banda, els nivells de transaminases en sèrum com a indicador de necrosi hepàtica, i de l'altra, l'activitat caspasa 3 en extractes hepàtics com a indicador d'apoptosi. Aquests paràmetres van ser analitzats catorze dies després de la infecció amb la dosi intermitja d'adenovirus. No es van observar signes aparents de necrosi hepàtica a nivell macroscòpic durant la necròpsia, ni tampoc nivells de GPT en sèrum significativament fora dels marges de la normalitat en aquest model de ratolí (Figura 45 A). A més, tampoc es van trobar signes d'apoptosi, estimats com a l'activitat caspasa 3 hepàtica (Figura 45 B). D'altra banda també es va voler investigar si les seqüències de shRNA dissenyades (Ff i 664) eren inductores de toxicitat a les dosis emprades en aquest estudi, ja que, s'ha descrit que algunes seqüències de siRNA i shRNA desencadenen un efecte tòxic (159; 160; 163) que pot arribar a ser letal (164). Aquesta possibilitat es va descartar en no trobar activació de l'expressió gènica de l'enzim 2'oligoadenilat-ciclasa (OAS2), un dels gens diana de la via d'activació de RNAsaL i mediador dels efectes tòxics derivats del dsRNA (Figura 45 C). Addicionalment, durant el període experimental, no es van observar signes de malaltia fora dels relacionats amb la patologia diabètica del model de ratolí db/db.



**Figura 45. El tractament de ratolins db/db amb adenovirus recombinants per shRNA no s'acompanya de signes greus de toxicitat derivats de la infecció amb adenovirus recombinants de seqüències de shRNA.** Ratolins db/db es van infectar amb  $2.5 \times 10^9$  p.f.u. d'adenovirus control (AdU6-Ff) o codificant per un shRNA per PEPCKC (AdU6-664), o amb salí fisiològic (CT). Catorze dies després es van analitzar els nivells de transaminases en sèrum (A), l'activitat caspasa 3 en fetge (B) i l'expressió gènica relativa de la 2'oligoadenilat-ciclasa (OAS2) en fetge (C). Com a controls positiu i negatiu d'apoptosi es van utilitzar extractes hepàtics de ratolins no diabètics injectats intraperitonealment, amb salí o galactosamina + LPS tal i com es descriu als Materials i mètodes.

En vista dels resultats descrits es van fixar les condicions experimentals de l'estudi, tal i com s'il·lustra a la figura 46 i es detalla a continuació:

Per a obtenir un efecte de silenciament parcial de PEPCK-C al fetge dels ratolins db/db es va optar per una dosi d'adenovirus intermitja ( $2.5 \times 10^9$  p.f.u.). La supressió parcial de PEPCK-C podria, hipotèticament, ser suficient per a tenir un efecte positiu sobre l'homeòstasi de la glucosa sense afectar negativament el metabolisme energètic, és a dir, mantenint una cataplerosi suficient per a sustentar el cicle de Krebs. Per a aconseguir una silenciament total o quasi total de PEPCK-C al fetge dels ratolins db/db es va optar per emprar la dosi alta ( $5 \times 10^9$  p.f.u.). En posteriors experiments, aquestes càrregues virals, van ser corregides pel pes mig dels animals (32 grams), per tal d'estandarditzar les dosis aplicades a cada animal i minimitzar la variabilitat deguda a la càrrega viral. Així, la dosi intermitja correspon a  $6.67 \times 10^{10}$  p.f.u./kg i la dosi alta correspon a  $13.34 \times 10^{10}$  p.f.u./kg.

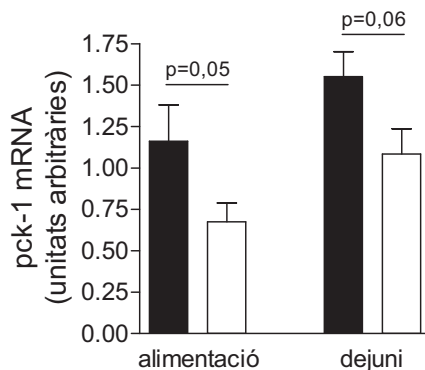


**Figura 46.** Protocol experimental aplicat en la infecció de vectors adenovirals de shRNA en ratolins db/db.

Els experiments es van finalitzar dues setmanes després de la infecció, un període mitjà que ens podria permetre veure el possible efecte sobre el desenvolupament de la resistència a insulina i obesitat en el model de ratolí diabètic db/db. Aquest punt va ser escollit en base a dos fets: a) en els experiments en els que vam assajar la capacitat de silenciament a diferents temps, vam trobar la millor eficiència a les dues setmanes de la infecció (Figura 43) i b) el model de ratolí diabètic db/db

presenta un patró progressiu de desenvolupament d'hiperinsulinèmia, hiperglucèmia i resistència a insulina, que s'inicia a partir de la quarta setmana d'edat. La injecció de l'adenovirus es realitzà entre la sisena i vuitena setmanes de vida, moment en que la fisiopatologia diabètica està en plena progressió. Finalment, i donat el nostre interès d'estudiar els efectes indirectes de la silenciació de PEPCK-C hepàtica sobre l'homeòstasi de la glucosa i els lípids, la majoria dels anàlisi es van realitzar en alimentació, excepte que no s'indiqui el contrari. Alternativament, amb l'objectiu d'anализar alguns aspectes puntuals es van realitzar anàlisis (gàbies metabòliques, IPITT, IPGPT, IPGTT...) després de sotmetre els animals a dejuni.

Aplicant les condicions anteriorment descrites, el tractament amb AdU6-664 aconsegueix una reducció d'aproximadament un 50% en l'abundància de el mRNA de Pck1 en situació d'alimentació, en comparació amb l'adenovirus control AdU6-Ff ( $58.1 \pm 10.3$  vs.  $100 \pm 19.9$  unitats relatives). El percentatge de mRNA silenciada es redueix a un 25% quan l'animal és sotmès a un dejuni d'una nit ( $93.3 \pm 13.1$  vs.  $133.5 \pm 13.1$  unitats relatives), tal i com es pot apreciar a la figura 47. Cal destacar que la reducció neta d'mRNA de Pck1 és la mateixa tant en dejuni com en alimentació, per tant, la capacitat de silenciament podria dir-se que és constant, sent l'increment en l'abundància del mRNA de Pck1 (un 33%) el responsable del menor percentatge de silenciament en dejuni. Com s'ha explicat a l'apartat introductori, PEPCK-C està regulada exclusivament a nivell transcripcional a través de l'eix insulina/glucagó i, en dejuni i diabetis, la taxa de transcripció es veu incrementada (Figura 15).

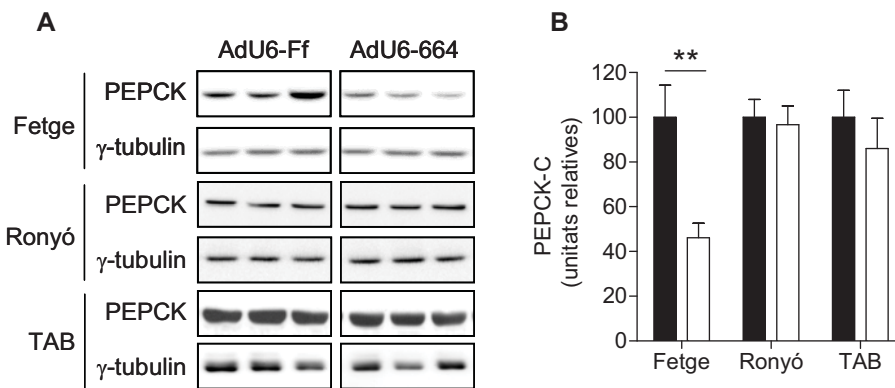


**Figura 47. Silenciació post-transcripcional del gen Pck1.** Ratolins db/db d'entre 6 i 8 setmanes d'edat van ser infectats amb una dosi intermitja de  $6.67 \times 10^{10}$  p.f.u./Kg d'adenovirus recombinant codificant per a un shRNA inespecífic (AdU6-Ff) o específic contra PEPCK-C (AdU6-664). Dues setmanes després, l'anàlisi per PCR quantitativa a temps real confirma la reducció en el contingut del mRNA de Pck1 al fetge tant en alimentació ( $p=0.05$ , test T de Student,  $n=11$ ) com en dejuni ( $p=0.06$ , test t de Student,  $n=6$ ). Les dades representen la mitja  $\pm$  ES de la quantitat de mRNA de Pck1 respecte als animals control (infectats amb AdU6-Ff) en alimentació.



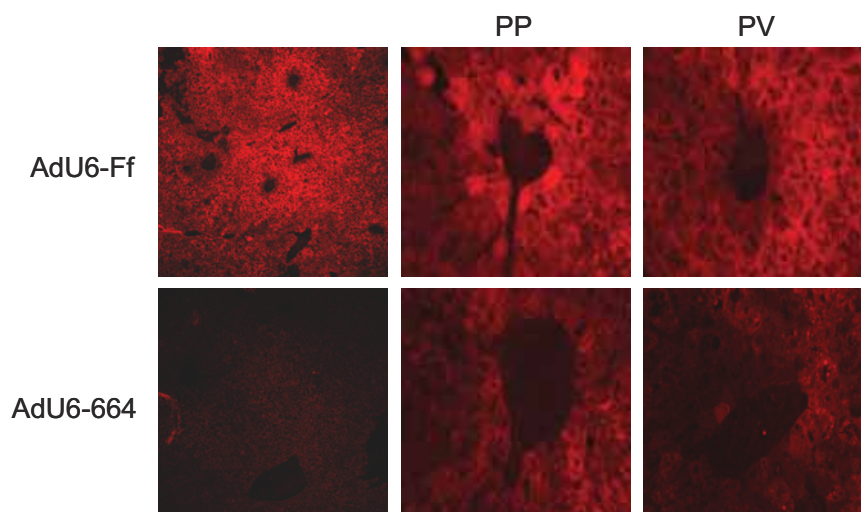
En correlació amb l'anàlisi del mRNA, l'anàlisi per Western blot del contingut proteic de PEPCK-C (Figura 48 A) confirma la major eficiència de silenciament de PEPCK-C al fetge en els animals en estat d'alimentació. La quantificació densitomètrica dels blots (Figura 48 B) demostra més d'un 50% de silenciament de PEPCK-C en alimentació ( $100 \pm 15.1$  vs.  $46.1 \pm 6.8$  unitats relatives;  $n=11$ ,  $p<0.01$ ), percentatge que es redueix a un 20%, aproximament, quan els animals són dejunats durant la nit abans a l'anàlisi ( $100 \pm 5.8$  vs.  $83.3 \pm 4.6$  unitats relatives;  $n=5$ ;  $p<0.05$ ).

No hem d'oblidar, però, que PEPCK-C també és present en teixits com el ronyó i el teixit adipós, on hi té importants funcions en la gluconeogènesi i gliceroneogènesi, respectivament (70). És obvi, doncs, que per a evitar efectes no desitjats és important que la silenciament sigui específica al fetge. La selecció dels vectors adenovirals per a vehiculitzar els shRNA obeeix a una doble intenció: a) el tropisme natural dels adenovirus del serotip 5 pel fetge quan son administrats sistèmicament i b) l'elevada eficiència de transducció sobre aquest teixit (197). No obstant, vam voler confirmar que el tropisme selectiu dels adenovirus es corresponia amb un efecte de silenciament específic de teixit. Es va analitzar, per tant, el contingut proteic de PEPCK-C al ronyó i al teixit adipós epididimal. La figura 48 mostra que no hi ha cap efecte de silenciament en aquests teixits.



**Figura 48. Silenciament específic en fetge de PEPCK-C mitjançant un adenovirus recombinant codificant per un shRNA. A:** L'anàlisi per Western blot del contingut proteic de PEPCK en fetges d'animals alimentats (alim.) i dejunats (dej.), així com en ronyó i teixit adipós en alimentació. Tots els blots es van normalitzar per  $\gamma$ -tubulina. Es mostren membranes representatives, de tres experiments independents. **B:** Quantificació densitomètrica del contingut de PEPCK-C en alimentació en fetge, ronyó i teixit adipós. Fetge en alimentació:  $n=11$ ; fetge en dejuni:  $n=5$ ; ronyó:  $n=4$ ; TAB:  $n=4$ . Les dades representen les mitges  $\pm$  ES respecte el tractament control. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.05$ , test t de Student.

Adicionalment, l'anàlisi immunohistoquímic dels fetges mostra una reducció qualitativa en la intensitat del marcatge fluorescent, corresponent a PEPCK-C, en els fetges tractats AdU6-664 en comparació amb els tractats amb AdU6-Ff (Figura 49). La tinció no homogènia a través de l'eix porto-central suggereix una reducció absoluta constant del contingut de PEPCK-C, que està doncs, essent silenciada amb una potència similar en les regions perivenosa i periportal. Això es tradueix en una reducció relativa més potent a la regió pericentral, donada la distribució zonal de la PEPCK-C en un gradient decreixent al llarg de l'eix porto-central (63; 219).

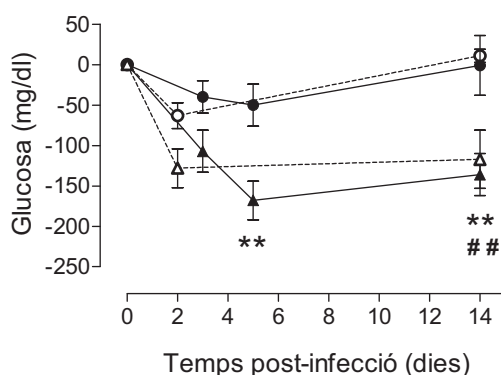


**Figura 49. Immunodetecció de PEPCK-C als fetges tractats amb els adenovirus recombinants codificants per shRNA.** Catorze dies després de la infecció amb els adenovirus recombinants es van obtenir es fetges en alimentació i es van realitzar crioseccions de 7  $\mu$ m, sobre les quals es va immunodetectar PEPCK-C. La distribució de PEPCK-C a través de l'acinus hepàtic en ratolins db/db alimentats es mostra en vermell. Els panells de l'esquerra són ampliacions 100X i els del mig i l'esquerra detalls 400X de les regions periportals (PP) i perivenoses (PV), respectivament.

### **La reducció del contingut de PEPCK-C hepàtica millora l'homeòstasi de la glucosa.**

Vàrem voler constatar els efectes de la reducció de PEPCK-C en fetge sobre l'homeòstasi de la glucosa en el context de la diabetis tipus II. L'evolució de la glucèmia en alimentació es va controlar periòdicament, durant dues setmanes, i es va comparar amb la glucèmia a l'inici del tractament de cada animal (Figura 50). Es va confirmar un clar efecte hipoglucemiant del tractament amb AdU6-664, respecte dels tractaments control (injectat amb salí) i AdU6-Ff (adenovirus control). El màxim

efecte hipoglucemiant es va trobar al cinquè dia posterior a la infecció, i es mantenia fins a la finalització de l'experiment. Un fet molt interessant és l'efecte coincident sobre la glucèmia en alimentació entre la reducció parcial de PEPCK-C i el tractament oral amb metformina, fàrmac antidiabètic emprat per al tractament de la diabetis tipus II.

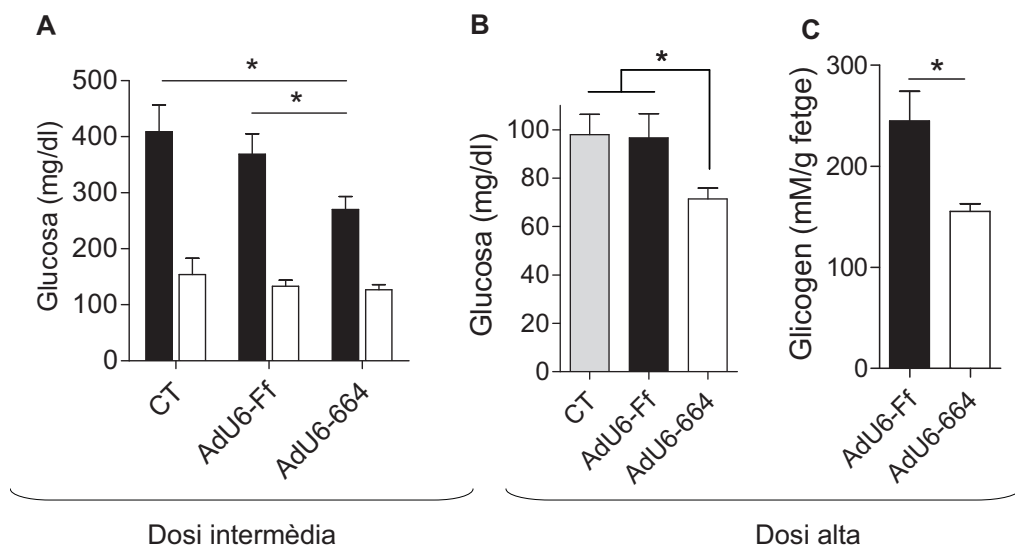


**Figura 50. Efecte sobre la glucèmia de la reducció parcial de PEPCK-C hepàtica. A:** La glucèmia es va mesurar a les 8 h del matí, els dies indicats posteriors a la infecció en els grups injectats amb salí (CT, n=5, cercles blancs), adenovirus control (AdU6-Ff; n=19; cercles negres) i adenovirus codificant per l'shRNA de PEPCK (AdU6-664; n=19; triangles negres) a una dosi intermitja, o bé en animals administrats amb una dosi diària oral de 400 mg/Kg de metformina a través de l'aigua de beguda durant les dues setmanes de durada de l'experiment (MET; n=5; triangles blancs). Les dades representen les mitges  $\pm$  error estàndard de la diferència entre la glucèmia en el dia indicat respecte de la glucèmia a dia 0, és a dir, prèvia a l'inici de l'experiment. La significació estadística es determina mitjançant un test t de Student. \*  $p < 0.05$  i \*\*  $p < 0.01$ , AdU6-664 vs AdU6-Ff; ##  $p < 0.01$  MET vs CT

Dues setmanes després de la infecció amb l'adenovirus codificant pel shRNA contra la PEPCK-C l'efecte hipoglucemiant en alimentació persistia i, a més, era estadísticament significatiu (Figures 50 i 51 A). La glucèmia en alimentació del AdU6-664 ( $271 \pm 23$  mg/dl, n=19) era significativament inferior, tant respecte al grup control injectat amb salí (CT) ( $409 \pm 48$  mg/dl, n=5), com al grup infectats amb l'adenovirus codificant pel shRNA inespecífic (AdU6-Ff) ( $370 \pm 38$  mg/dl, n=19).

En contraposició, la glucèmia en dejuni no va experimentar cap canvi en resposta al tractament amb la dosi intermitja (Figura 52). Aquest fet es podria explicar per una compensació de la glucèmia en dejuni a través de la glicogenòlisi, com suggereix la reducció ostensible del contingut de glicogen hepàtic en dejuni en el grup AdU6-664 (Taula 13). En canvi, sí que es va poder observar una reducció en la glucèmia en dejuni quan el contingut hepàtic de PEPCK-C residual quedava reduït a

un 10% aproximadament, mitjançant la injecció amb la dosi alta d'adenovirus. A més, en els animals tractats amb aquesta dosi alta, el contingut de glicogen hepàtic es reduí sensiblement fins i tot en alimentació (Figura 51 C). Aquestes dades, juntament amb l'anàlisi dels nivells residuals de mRNA i proteïna en alimentació i dejuni amb la dosi intermitja que s'han mostrat a les figures 47 i 48, són suggestives de que, en dejuni, degut a l'increment del mRNA de Pck1, l'eficiència de silenciament decreix i resulta, a la dosi intermitja testada, insuficient per a contrarestar la hiperglucèmia en dejú. Sembla ser, doncs, que es requereix un increment de la dosi d'adenovirus per a silenciar PEPCK-C per sobre d'un llindar per a que aquest silenciament es reflexi en un efecte hipoglucèmiat en dejuni.

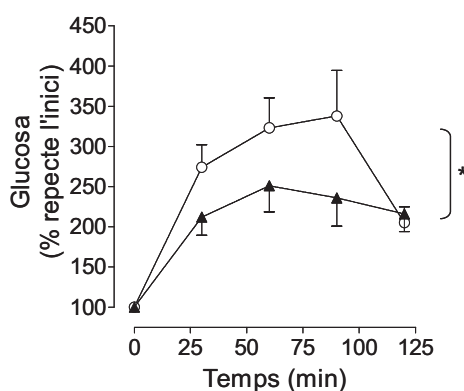


**Figura 51. Efecte sobre la glucèmia de la reducció parcial vs reducció total de PEPCK-C hepàtica. A:** Ratolins db/db d'entre 6 i 8 setmanes d'edat van ser infectats amb una dosi intermitja de  $6.67 \cdot 10^{10}$  p.f.u./Kg.: Glucèmia catorze dies després de la injecció en alimentació (barres negres) o set dies després del tractament en dejuni de 32 hores (barres blanques). La significació estadística es determinà mitjançant un test t de Student;  $*p < 0.05$ . **B:** Glucèmia en dejuni (32 hores) catorze dies després de la infecció amb la dosi alta ( $13.34 \cdot 10^{10}$  p.f.u./Kg).  $*p < 0.05$ , CT: n=5; AdU6-Ff i AdU6-664: n=9, test t de Student. **C:** Contingut de glicogen hepàtic en animals alimentats vint-i-un dies després de la infecció amb la dosi alta d'adenovirus. n=9,  $*p < 0.05$ , test t de Student. Les dades representen les mitges  $\pm$  error estàndard.

La reducció sostinguda en el temps de la glucèmia observada en els ratolins db/db en resposta al tractament amb AdU6-664 podria esdevenir com a: a) resultat directe de la reducció de la producció hepàtica de glucosa, secundària a la reducció de la activitat enzimàtica PEPCK-C al fetge, o b) conseqüència indirecta d'una millora en la sensibilitat a glucosa i/o a la insulina. Aquestes possibilitats es van investigar a continuació:

## Regulació coordinada de la gluconeogènesi hepàtica

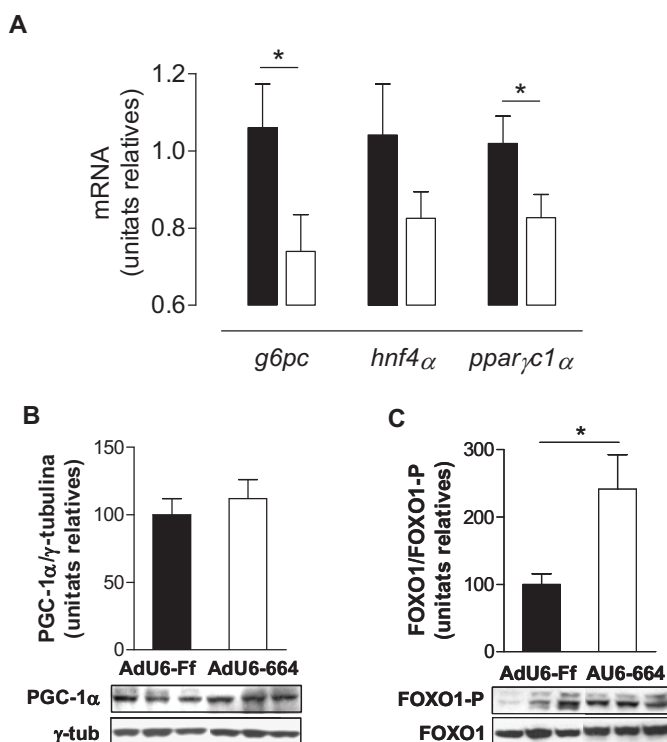
Per tal d'avaluar com afecta a un fetge diabètic la disminució del contingut de PEPCK-C sobre el flux gluconeogènic i la producció hepàtica de glucosa, es va assajar la producció de glucosa a partir de piruvat in vivo. A tal efecte es va realitzar un assaig intraperitoneal de producció de glucosa (IPGPT), en el qual els ratolins són injectats intraperitonealment amb una solució de piruvat i, seguidament, es segueix l'evolució de la glucèmia durant les dues hores posteriors. En l'IPGPT els fetges amb un contingut inferior de PEPCK-C mostraren una capacitat significativament inferior de generar glucosa a partir de piruvat (Figura 52). L'àrea sota la corba, indicativa de la glucosa produïda a partir de piruvat, és un 35% inferior en el grup AdU6-664, respecte del grup control AdU6-Ff, suggerint que aquests fetges tenen una menor capacitat gluconeogènica. En consonància, els fetges dels ratolins tractats amb AdU6-664, quan eren sotmesos a dejú, tenien un contingut de glicogen significativament inferior (Taula 13), reforçant la idea de que la reducció del contingut de PEPCK-C al fetge hi comporta una reducció en la capacitat gluconeogènica.



**Figura 52. Capacitat de producció hepàtica de glucosa reduïda com a conseqüència de la silenciament de PEPCK-C al fetge.** La producció hepàtica de glucosa es va avaluar in vivo assajant la producció de glucosa a partir de piruvat en un IPGPT. Set dies després de la infecció amb AdU6-Ff o AdU6-664, els ratolins es van posar en dejuni durant 32 hores i se'ls va injectar i.p. un bolus de piruvat (2g/Kg). L'evolució de la glucosa en sang es va controlar als temps indicats. AdU6-664 (triangles negres), AdU6-Ff (cercles blancs). El test estadístic ANOVA bidimensional va detectar diferències significatives de la corba entre els dos grups ( $p < 0.05$ ). Les dades són les mitges  $\pm$  ES;  $n=9$ .

També es va analitzar els nivells d'expressió dels gens codificants per a enzims i factors de transcripció implicats en la gluconeogènesi. La glucosa 6-fosfatasa catalitza l'últim pas de la via gluconeogènica i glicogenolítica i és, per tant responsable de la regulació de l'alliberació de glucosa pel fetge. Tant la glucosa 6-fosfatasa (codificat per G6pc), com la PEPCK-C (codificat per Pck1)

estan regulats a nivell transcripcional per factors de transcripció com HNF4- $\alpha$  (codificat per *Hnf4- $\alpha$* ) i PGC-1 $\alpha$  (codificat per *Ppargc1 $\alpha$* ), el mRNA dels quals minvava en els animals amb PEPCK-C silenciada en alimentació (Figura 53 A). Malgrat tot, aquesta reducció a nivell de mRNA no es veia reflexada a nivell de proteïna: el contingut proteic de PGC-1 $\alpha$  en extractes nuclears romangué invariable en els dos grups experimentals (Figura 53 B). No obstant, segons Puigserver i col·laboradors (72), l'activació transcripcional de gens gluconeogènics com *Pck1* i *G6pc* requereix una acció coordinada entre HNF4- $\alpha$  i PGC-1 $\alpha$ ; per tant, la reducció de HNF4- $\alpha$  mesurada en els animals AdU6-664 podria ser suficient per a suposar una regulació negativa de la via.



**Figura 53. Reducció coordinada dels gens gluconeogènics com a conseqüència de la silenciació de PEPCK-C al fetge.** **A:** Els nivells de mRNA de gens implicats en la gluconeogènesi (*G6pc*, *Hnf4- $\alpha$*  and *Ppargc1 $\alpha$* ) van ser quantificats en mostres de fetge d'animals alimentats dues setmanes després del tractament amb AdU6-Ff (n=10; columnes negres) o AdU6-664 (n=11; columnes blanques). Cada valor representa la mitja de cada grup relativa a la mitja del grup control  $\pm$  ES. \*p<0,05, test t de Student. **B:** Anàlisi per Western blot (panell inferior) i quantificació densitomètrica (n=6; panell superior) del contingut nuclear de PGC-1 $\alpha$  en extractes nuclears de fetges. La càrrega del gel es va normalitzar amb  $\gamma$ -tubulina **C:** Anàlisi per Western blot (panell inferior) i quantificació densitomètrica (panell superior; n=10) del grau de fosforilació de FOXO1 al residu Ser<sup>256</sup> en extractes totals de fetges. El contingut de FOXO1 total es va fer servir com a normalitzador.

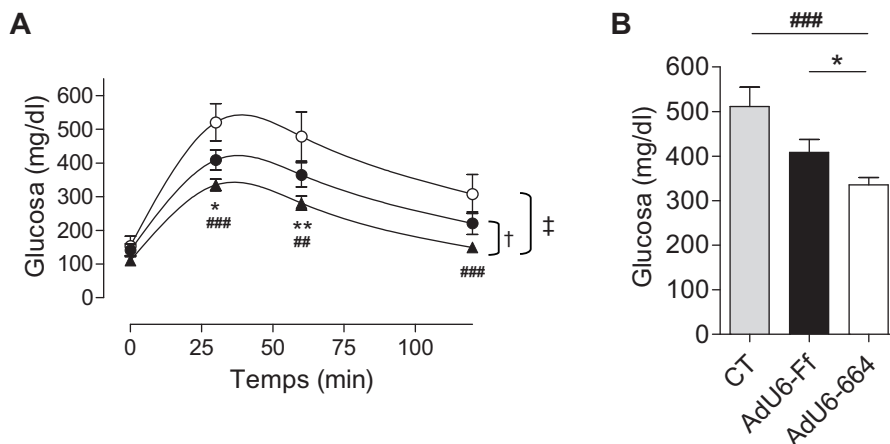
D'altra banda, el grau de fosforilació de FOXO1 al residu Ser<sup>256</sup> es veu incrementat sensiblement en extractes totals de fetges en alimentació en els ratolins AdU6-664 en comparació amb els AdU6-Ff (Figura 53 C). En absència d'insulina (en dejuni o situacions de resistència a la hormona), FOXO1 forma part d'un complex transcripcional amb PGC-1 $\alpha$  i HNF4- $\alpha$  i s'uneix als motius IRE dels promotors dels gens gluconeogènics com Pck1 i G6pc. En resposta a insulina, FOXO1 és fosforilat per AKT, fet que comporta la seva exclusió nuclear, contribuint així a la reducció en la transcripció d'aquests gens gluconeogènics. Per tant, el major grau de fosforilació de FOXO-1 podria ser un efecte derivat de la millora de la sensibilitat a insulina. FOXO1 ha estat descrit com a mediador de la senyalització d'insulina en la regulació negativa dels gens gluconeogènics (79) i la supressió de la seva activitat transcripcional comporta una reducció de la producció hepàtica de glucosa acompanyada d'una millora l'homeòstasi de la glucosa i en la sensibilitat a la insulina tant al fetge com als teixits perifèrics (118; 120). Aquestes dades suggereixen que una possible millora en la senyalització de la via d'insulina en resposta a la silenciació parcial de PEPCCK-C contribueix a l'increment de la fosforilació depenent d'AKT sobre FOXO1, contribuint així a una retroalimentació en la regulació negativa de la gluconeogènesi.

### **La reducció del contingut de PEPCCK-C hepàtica millora la sensibilitat perifèrica a la glucosa i a la insulina**

Es va analitzar, a continuació, la possible millora en la sensibilitat a insulina. Es va avaluar la capacitat de captació de glucosa sistèmica en un test de tolerància a la glucosa. Vam observar una millora en la tolerància a la glucosa en el grup AdU6-664, amb una reducció significativa de l'àrea sota la corba d'un 40% i un 20% en comparació amb els grups CT i AdU6-Ff, respectivament (Figura 54 A). Tot i partir del mateix punt, el pic hiperglicèmic als 30 minuts després del bolus és significativament inferior en el grup AdU6-664 (Figura 54 B). Això podria ser indicatiu d'una major capacitat d'aclarament del bolus de glucosa pel fetge i/o pels teixits perifèrics.

En concordància amb els resultats de glucèmia i sensibilitat a glucosa, la insulinèmia es va reduir significativament al grup AdU6-664, tant en alimentació com en dejuni (Figura 56 A). Addicionalment, es va fer una estimació del grau de resistència a insulina a partir de l'índex QUICKI (223), que permet avaluar quantitativament la sensibilitat a insulina d'un individu a partir dels valors d'insulinèmia i glucèmia en dejuni segons una senzilla fórmula (Figura 55). La inversa de l'índex QUICKI ens dona l'índex de resistència a insulina (IR). Els animals tractats amb AdU6-664 tenien un IR

significativament inferior als dels animals control ( $2.38 \pm 0.01$ ,  $n=14$  vs.  $2.74 \pm 0.07^{**}$ ,  $n=5$ , i vs.  $2.53 \pm 0.01^*$ ,  $n=14$ ; test t de Student, AdU6-664 vs. CT i vs. AdU6-Ff, respectivament).



**Figura 54. Millora de la tolerància a la glucosa després del tractament amb AdU6-664.** A: Set dies després del tractament, ratolins prèviament dejunats per un període de 32 hores van ser sotmesos a un test de tolerància a glucosa (IPGTT). Un bolus de 1g/Kg de glucosa es va injectar intraperitonealment. La glucèmia es va controlar en els temps indicats (CT;  $n=5$ , AdU6-Ff;  $n=13$ , AdU6-664,  $n=12$ )  $*p<0.05$  AdU6-664 vs AdU6-Ff;  $^{##}p<0.01$ ;  $^{###}p<0.001$  Ad-U6-664 vs CT segons un test t de Student. La significació estadística es va determinar mitjançant un test ANOVA bidimensional. Els grups CT i AdU6-Ff no es comporten significativament diferent entre ells, però sí respecte el grup AdU6-664 ( $^{\ddagger}p<0.001$  i  $^{\dagger}p<0.05$  respectivament). B: Glucèmia als 30 minuts després de la injecció del bolus de glucosa. Les dades representen les mitges  $\pm$  ES.

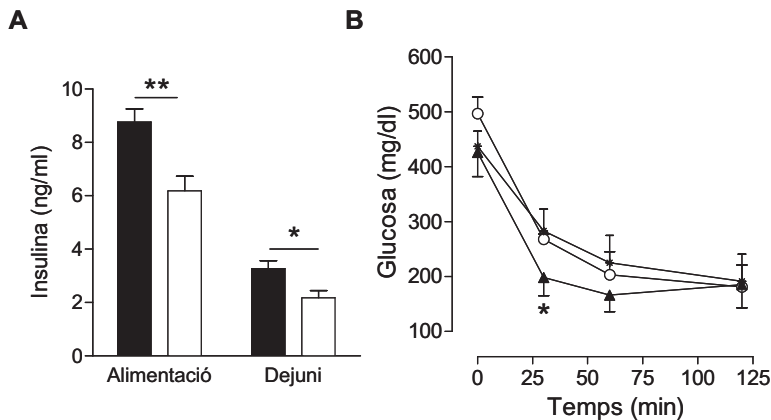
$$\text{QUICKI} = \frac{\text{glucèmia en dejú (mg/dl)}}{\text{Log}_{10} \left( \frac{\text{glucèmia en dejú (mg/dl)}}{\text{insulinèmia en dejú (ng/ml)}} \right)}$$

**Figura 55. Càlcul de l'índex QUICKI.**

Finalment, una tercera evidència que apunta a una millora en el grau de sensibilitat a insulina indirectament derivada de la disminució de PEPCK-C en fetge en als ratolins diabètics db/db, és la major resposta hipoglucèmicant en front a un bolus d'insulina d'aquests animals tenien en comparació amb els grups control (Figura 56 B).



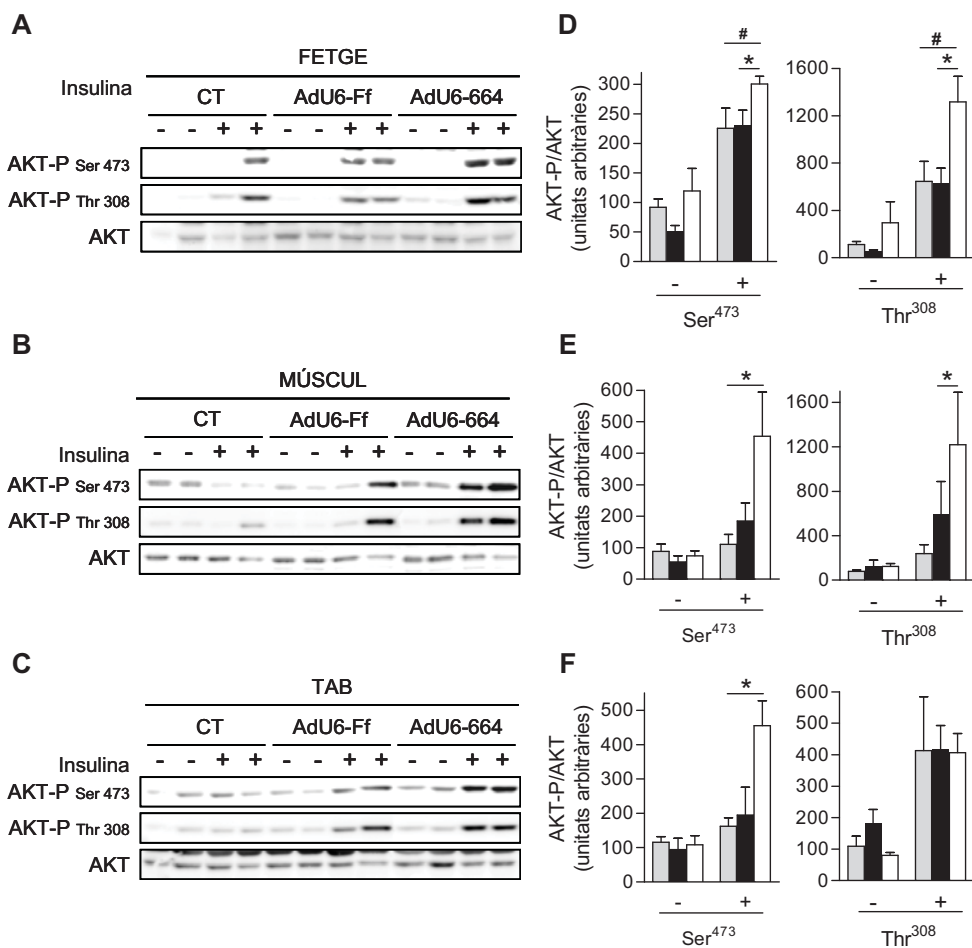
En conjunt, aquestes dades demostren que una reducció parcial del contingut de PEPCK-C al fetge té un efecte beneficiós sobre la tolerància perifèrica a glucosa en els ratolins diabètics db/db i suggereixen una millora en la senyalització de la insulina en els teixits perifèrics.



**Figura 56. Millora de la insulinèmia i la resposta a insulina en els animals tractats amb AdU6-664.** **A:** Els nivells d'insulina plasmàtica es van mesurar a dia catorze post-infecció en animals alimentats (AdU6-Ff; n=5 i AdU6-664; n=4) o a dia set després d'un dejuni de 32 hores. AdU6-Ff; n= 13, AdU6-664; n=12, \*p<0.05, \*\* p<0.05, test t de Student. **B:** El test de tolerància a insulina es va realitzar vuit dies després de la infecció en animals alimentats. Un bolus d'insulina de 2 IU/kg es va injectar intraperitonealment. La glucèmia es va controlar als temps indicats (CT: cercles blancs, n=5; AdU6-Ff: cercles negres, n= 8 i AdU6-664: triangles negres, n=9). \*p<0.05, test t de Student CT vs AdU6-664. p=0.09 AdU6-664 vs AdU6-664

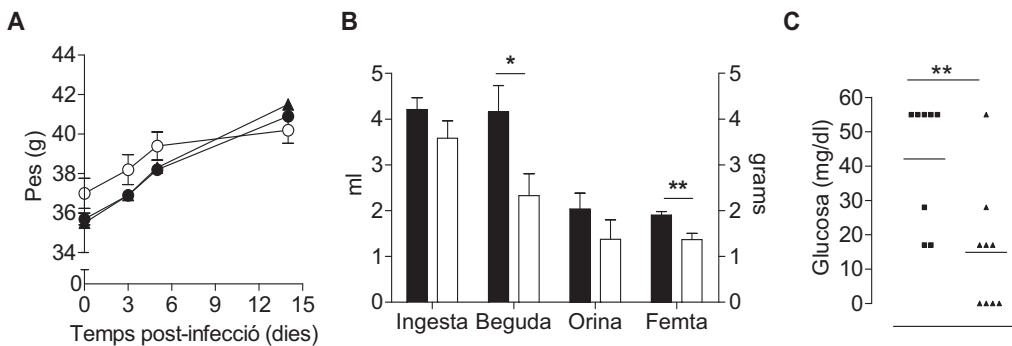
A continuació, per a refermar la hipòtesi d'una millora en la sensibilitat a la insulina als teixits perifèrics, vam avaluar la via de senyalització d'insulina. La unió de la insulina al seu receptor, provoca una cascada de fosforilacions que activa la via de transducció de senyals de PI3K, a través de la qual AKT és fosforilada als residus serina 473 i treonina 308. Un cop fosforilada, AKT fosforila i regula l'activitat d'altres enzims i factors de transcripció. A fetge, AKT fosforila FOXO-1 promovent la seva exclusió nuclear i bloquejant així la seva activitat transcripcional sobre els gens gluconeogènics (79). Al múscul i teixit adipós, promou el transport de glucosa a través del transportador Glut4. També promou la síntesi de glicogen a través de la fosforilació de GSK3 $\beta$  a múscul i fetge. Com a indicador de la funcionalitat de la via de senyalització de la hormona es va analitzar el nivell d'activació d'AKT al fetge, teixit adipós i múscul (segons el grau de fosforilació d'AKT als residus Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup>) en resposta a un bolus d'insulina de 10 U/kg, que produeix un pic en la fosforilació de IR i IRS-1 als 5 minuts (224). Als ratolins db/db, com a conseqüència de la resistència a insulina, aquest pic de

fosforilació està atenuat, en comparació amb un ratolí sa. Aquest experiment, per tant, ens aporta informació sobre la capacitat de la insulina d'activar d'AKT.



**Figura 57. Millora de la senyalització d'insulina.** La senyalització d'insulina en fetge i teixits perifèrics (teixit adipós i múscul) es va estimar segons el grau de fosforilació d'AKT en resposta a un bolus d'insulina (10 IU/kg) en ratolins db/db dejunats durant la nit set dies després de la injecció amb salí (CT), adenovirus control (AdU6-Ff), o adenovirus codificant per a un shRNA contra la PEPCK-C (AdU6-664). Es van prendre mostres dels teixits tant abans (-) com cinc minuts després (+) del bolus d'insulina. El grau de fosforilació als residus Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup>, així com el contingut total d'AKT es va detectar per Western blot en fetge (A), múscul (B) i teixit adipós epididimal(C). La quantificació densitomètrica corresponent a fetge (D), múscul (E) i teixit adipós epididimal (F) es mostra a les gràfiques de la dreta. Les barres grises representen el grup CT, les negres el grup AdU6-Ff i les blanques el grup AdU6-664. n=4-6; # p=0.05, \*p<0.05, \*\*p<0.01, test t de Student.

Als grups control no infectat (CT) i AdU6-Ff la fosforilació d'AKT als residus Ser<sup>473</sup> i Thr<sup>308</sup>, o bé es manté als nivells basals, o incrementa suaument en resposta al bolus d'insulina. En contraposició, al grup AdU6-664 hi ha un increment ostensible en el grau de fosforilació d'AKT a la Ser<sup>473</sup> després del bolus d'insulina, tant al fetge com al teixit adipós i al múscul esquelètic (Figura 57). En canvi, la fosforilació a la Thr<sup>308</sup> és sensiblement superior en el grup AdU6-664 al fetge i al múscul, però no al teixit adipós. No obstant, Ono et al. (225) han descrit que, als adipòcits, la fosforilació d'aquest residu està regulat negativament per PTEN (proteïna fosfatasa que desfosforila el PIP<sub>3</sub> (fosfoinositol-(3,4,5)-trifosfat), resultant en la inactivació d'AKT), però que aquesta regulació no limita la captació de glucosa en resposta a insulina, procés regulat estretament per la fosforilació sobre el residu Ser<sup>473</sup>. D'altra banda un major grau de fosforilació de FOXO-1 en alimentació als fetges dels ratolins tractats amb AdU6-664 (Figura 53 C), també és indicatiu d'una millora en la sensibilitat a insulina al fetge indirecta a la silenciació parcial de PEPCK-C. Aquestes dades confirmen una millora en la capacitat de senyalització d'insulina no només al fetge sinó també als teixits perifèrics, com a conseqüència de la reducció parcial de PEPCK-C hepàtica en el model murí de resistència a insulina db/db.



**Figura 58. Efecte sobre el fenotip d'obesitat i diabetis de la reducció parcial de PEPCK-C hepàtica. A:** Pes dels ratolins pres a les 8 del matí des del dia de la injecció amb salí (CT, n=5, cercles blancs), adenovirus control (AdU6-Ff; n=19; cercles negres) i adenovirus codificant per l'shRNA de PEPCK (AdU6-664; n=19; triangles negres). **B:** Set dies després de la infecció amb adenovirus control (AdU6-Ff; n=6; barres negres) i adenovirus codificant pel shRNA de PEPCK (AdU6-664; n=6; barres blanques) es van introduir els animals en gàbies metabòliques durant 24 hores. Es van recollir i/o quantificar la ingesta, beguda, orina i femtes. Les dades són les mitges  $\pm$  ES. t de Student: \*p<0.05; \*\* p<0.01. **C:** Vint-i-un dies després de la infecció amb la dosi alta d'adenovirus es va analitzar el contingut de glucosa en la orina dels animals en estat d'alimentació mitjançant un "Urine test" (Combur<sup>®</sup> test, Boheringer). Les dades representen els valors individuals dels ratolins dels grups AdU6-Ff (■) i AdU6-664 (▲). Es van analitzar 8 i 9 animals de cada grup, respectivament.

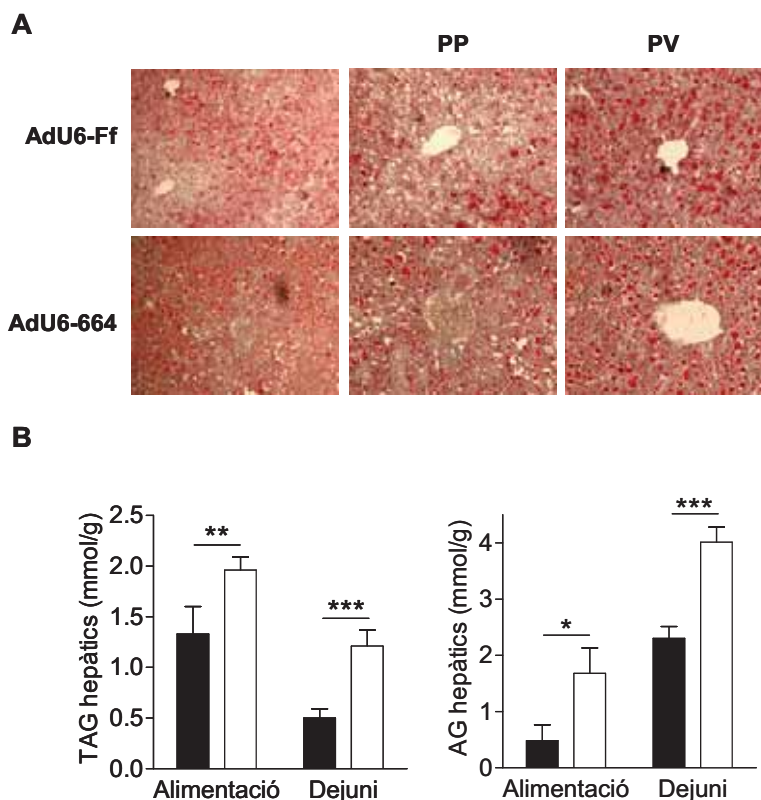
La polifàgia (increment de la ingesta), la poliúria (diüresi osmòtica), la polidipsia (increment de la set) i la glucosúria (presència de glucosa a la orina) són símptomes característics de la diabetis tipus II, que sovint va acompanyada d'obesitat, tret característic del model animal emprat en l'estudi. Per a determinar si els canvis a nivell molecular i en els diferents tests de sensibilitat a glucosa i insulina descrits tenien un reflex en la millora del fenotip diabètic, es va controlar l'increment de pes durant la durada dels experiment i es van realitzar estudis de gàbies metabòliques. Addicionalment, es va determinar la concentració de glucosa a la orina recollida de la bufeta dels animals en la necròpsia. Aquests estudis demostraren una millora del fenotip diabètic de polidipsia, poliúria polifàgia, i glucosúria però no en el desenvolupament de la obesitat, tal i com es mostra a la figura 58.

### **Conseqüències de la silenciació hepàtica de PEPCK-C sobre el metabolisme lipídic**

La dislipidèmia i la lipidosi hepàtica són característiques del fenotip diabètic. Amb l'objectiu d'investigar els efectes de la silenciació de PEPCK-C sobre el metabolisme lipídic, es van mesurar diferents paràmetres sanguinis i hepàtics. En l'anàlisi del matabòlits sèrics es va observar una reducció en el contingut de triglicèrids (TAG) d'aproximadament un 33%, tant en alimentació com en dejuni; efecte que anava acompanyat d'una tendència a la baixa en els nivells d'àcids grassos lliures (AGL) d'un 15% en alimentació i d'un 36% en dejuni. També es va trobar una tendència a l'alça dels cossos cetònics ( $\beta$ -HBA) en sèrum d'un 33% en alimentació, percentatge que es duplica en dejuni i un increment net en el colesterol, amb un increment concomitant en la fracció HDL (Taula 12).

L'anàlisi histològic del fetge mostra micro i macro-vesícules lipídiques amb una distribució zonal preferent a la regió perivenosa als fetges control, coherent amb la zonació metabòlica dels enzims lipogènics al llarg de l'eix portocentral hepàtic (63; 64). Aquestes vesícules són característiques de la lipidosi hepàtica del model db/db. Les seccions dels fetges del grup tractat amb el shRNA contra la PEPCK-C mostren un increment global de micro i macro-vesícules lipídiques, la distribució de les quals tendeix a desplaçar-se cap a la zona periportal (Figura 59 A), on PEPCK s'expressa amb major intensitat. En correlació amb l'anàlisi histològic, l'anàlisi bioquímic dels fetges ens mostra un increment moderat (d'un 60%) en el contingut de triglicèrids (TAG) en fetge, però una acumulació ostensible (d'un 350%) d'àcids grassos (AG) en el grup AdU6-664 respecte del grup control AdU6-Ff, en alimentació. De forma similar, després en dejú, el contingut de TAG i AG es duplica en el grup AdU6-664 respecte del grup control AdU6-Ff (Figura 59 B). En conjunt, aquestes dades ens estarien suggerint que l'increment del contingut lipídic als fetges amb PEPCK-C silenciada, respon

majoritàriament a una acumulació d'àcids grassos a la zona periportal, més que no pas un increment de la síntesi de triglicèrids als hepatòcits perivenosos.



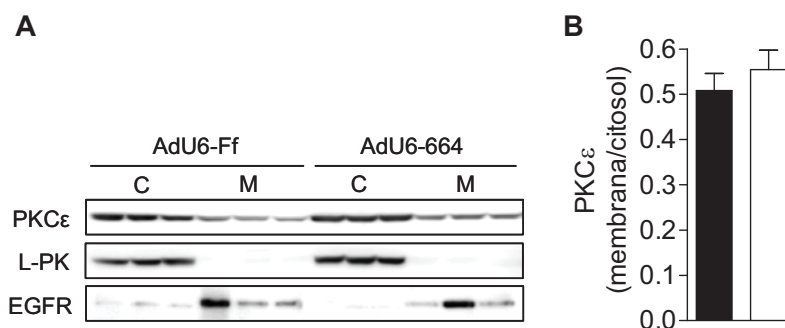
**Figura 59. La silenciació de PEPCK-C en fetge de ratolins db/db accentua lleugerament la lipidosi hepàtica. A:** Tinció oil red per a visualitzar els lípids hepàtics realitzada sobre crioseccions de 7µm dels fetges dels ratolins catorze dies post-infecció en alimentació. Els panells de la dreta mostren un camp global del fetge a una ampliació 100X. Ampliacions de les zones periportal (PP) i perivenosa (PV) es mostren a 200X. Les imatges són representatives de tres experiments independents. **B:** Quantificació del contingut de triglicèrids (TAG) i àcids grassos (AG) als fetges dels ratolins tractats amb el shRNA inespecífic (columnes negres, n=14) o dirigit contra PEPCK-C (columnes blanques; n=16) en alimentació o després d'un dejuni d'una nit. Les dades són les mitges ± ES, \*p<0,05, \*\*p< 0,01.

### Dissociació entre lipidosi hepàtica i resistència a insulina

La resistència a insulina associada a la lipidosi hepàtica, està associada a l'acumulació de diferents espècies lipídiques (com acil-CoA de cadena llarga, ceramides o diacilglicerol) que actuen com a segons missatgers en l'atenuació de la via de senyalització de la insulina (22; 24). En els animals on

la PEPCK-C en fetge es silencia parcialment, sorprenentment, tot i la lipidosi observada, la sensibilitat a insulina millora, tal i com es mostra a les figures 56 i 57. Aquest no deixa de ser un fet paradòxic que vam voler estudiar més en profunditat. Recentment, s'ha descrit el paper essencial de PKC $\epsilon$  en la mediació de l'atenuació de la senyalització d'insulina per part de segons missatgers de naturalesa lipídica (25). L'activació de PKC $\epsilon$  per aquestes espècies lipídiques, fan que transloqui a la membrana i bloquegi l'activació de IRS1/2 (Figura 3).

Ens vam proposar, doncs, estimar fins a quin punt la l'acumulació de TAG i AG als fetges tractats amb AdU6-664 podrien estar desencadenant aquests mecanismes d'inducció de resistència a insulina a través de la translocació de PKC $\epsilon$  a la membrana plasmàtica. Es va detectar per Western blot la PKC $\epsilon$  a la fracció membranosa i citosòlica d'homogenats hepàtics i es va quantificar el seu contingut a cada fracció per densitometria. Una major immunolocalització de PKC $\epsilon$  a la fracció membranosa seria indicativa d'un major grau de translocació a la membrana de la quinasa i, per tant, suggestiu de que hi està bloquejant la senyalització de la insulina. Per tant, la relació membrana/citosol de PKC $\epsilon$  servirà com a indicador molecular de la inducció per lípids de resistència a insulina.



**Figura 60. L'acumulació de lípids al fetge conseqüència de la silenciació de PEPCK-C no implica l'activació de les vies d'atenuació de la senyalització d'insulina per PKC $\epsilon$ .** A partir d'extractes totals de fetge, les fraccions citosòlica i membranosa es van separar per centrifugacions diferencials successives. **A:** 50  $\mu$ g de cada una de les fraccions es van separar en un gel desnaturalitzant de poliacrilamida i el contingut de PKC $\epsilon$  a cada fracció es va immunodetectar per Western blot. Com a marcadors de la fracció citosòlica i membranosa es van utilitzar piruvat quinasa hepàtica (L-PK) el receptor del factor de creixement epitelial (EGFR) respectivament. **B:** La quantificació desitomètrica de les bandes, corrobora que la proporció de proteïna translocada del citosol a la membrana plasmàtica no varia conseqüència de la silenciació de PEPCK-C. Les dades són les mitges  $\pm$  ES, n=6.

Els fetges dels ratolins db/db tractats amb el shRNA contra Pck1 no hi ha un major grau de translocació a membrana de PKC $\epsilon$  (Figura 60). Podem descartar, per tant, que en nostre model hi hagi una associació entre l'acumulació de lípids al fetge i l'atenuació de la senyalització d'insulina mediada per PKC $\epsilon$ .

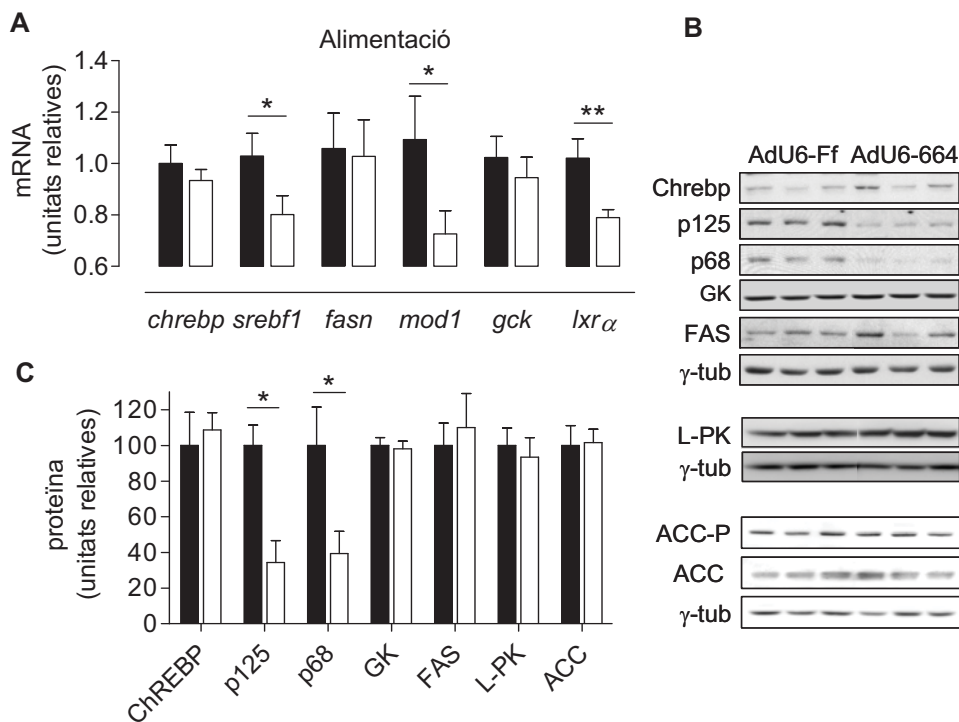
### **Paper integrador de PEPCK-C en el metabolisme energètic**

En el primer capítol d'aquest treball ja vam trobar indicis de que la reducció de PEPCK tenia implicacions més enllà de l'homeòstasi de la glucosa. Els resultats obtinguts en els models de ratolins gensuprimits han mostrat que, donat que l'activitat PEPCK-C és essencial en la cataplerosi, la supressió de l'enzim resulta en el bloqueig del cicle de Krebs i la funció mitocondrial al fetge. Com a conseqüència, hi ha una disminució de l'oxidació d'àcids grassos i del consum d'oxigen, acompanyat d'una desregulació total del metabolisme energètic i lipidosi hepàtica. Per tant, a continuació ens vam plantejar estudiar cada un d'aquests aspectes en el nostre model de silenciament parcial de PEPCK-C hepàtica en ratolins diabètics.

#### **Síntesi de novo de lípids**

Per a discriminar si els lípids acumulats als fetges dels ratolins tractats provenien d'un increment de la síntesi de novo, de la reesterificació o de l'import d'àcids grassos circulants en sang o, pel contrari, d'una disminució en la seva utilització ( $\beta$ -oxidació), es van analitzar el contingut proteic i l'expressió gènica de diferents enzims i factors de transcripció involucrats en el metabolisme lipídic.

LXR $\alpha$ , de la família dels receptors nuclears d'oxisterols, actua com a sensor de glucosa, colesterol i lípids i controla l'expressió de gens relacionats amb la síntesi de colesterol i àcids grassos, com SREBP-1c i ChREBP a través dels elements de resposta a LXR (LXRE) en els seus promotors (18). LXR $\alpha$  podria, per tant, estar mediant els efectes de la insulina i/o la glucosa sobre la lipogènesi hepàtica (226). Als fetges dels ratolins tractats amb el shRNA contra Pck1 el mRNA de Lxr $\alpha$  es redueix significativament, en comparació amb els ratolins tractats amb el shRNA control (Figura 61 A). Una disminució en la glucèmia, juntament amb el descens en la seva expressió, podrien contribuir a una menor activitat transcripcional sobre els seus gens diana.



**Figura 61. La silenciació de PEPCK-C als fetges dels ratolins db/db no activa la lipogènesi.** **A:** L'expressió d'alguns gens rellevants en la lipogènesi es va analitzar en fetges d'animals alimentats als catorze dies després de la infecció amb AdU6-Ff (n=10; columnes negres) o AdU6-664 (n=11; columnes blanques) per RT-PCR quantitativa en un sistema 7900HT Micro Fluidic Card d'Applied Biosystems. Les dades es van analitzar fent el càlcul de  $\Delta\Delta C_t$  utilitzant el gen de la  $\beta$ -2-microglobulina com a normalitzador. Els valors representen la mitja de cada grup relativa a la mitja del grup control  $\pm$  ES. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; test t de Student. **B:** Anàlisi per Western blot del contingut proteic de ChREBP, SREBP-1c, GK, FAS, L-PK i ACC, ACC-P Ser<sup>79</sup> en homogenats en tampó RIPA de fetges alimentats. Les membranes es van normalitzar amb  $\gamma$ -tubulina. Les imatges són representatives de tres experiments independents. **C:** Quantificació densitomètrica dels blots mostrats a B. Les dades són les mitjanes  $\pm$  ES; n=5-18; test T de Student.

SREBP-1c i ChREBP són factors de transcripció de la família hèlix-loop-hèlix que s'uneixen als elements de resposta a insulina (IRE) i als elements de resposta a glucosa (GRE) respectivament, i regulen de forma sinèrgica l'expressió dels gens lipogènics (FAS i ACC) i glicolítics (L-PK) al fetge en resposta a insulina i glucosa, respectivament (Figura 1). Després de la silenciació de PEPCK-C el nivell de mRNA d'aquests reguladors clau de la lipogènesi, o bé es manté estable, és el cas de ChREBP, o bé disminueix en un 25% aproximadament, com és el cas de SREBP-1c (Figura 61 A). Els nivells de proteïna corresponents corroboren el mateix patró: ChREBP roman constant, mentre que el contingut de les formes precursora (p125), localitzada al reticle endoplasmàtic, i activa (p68),

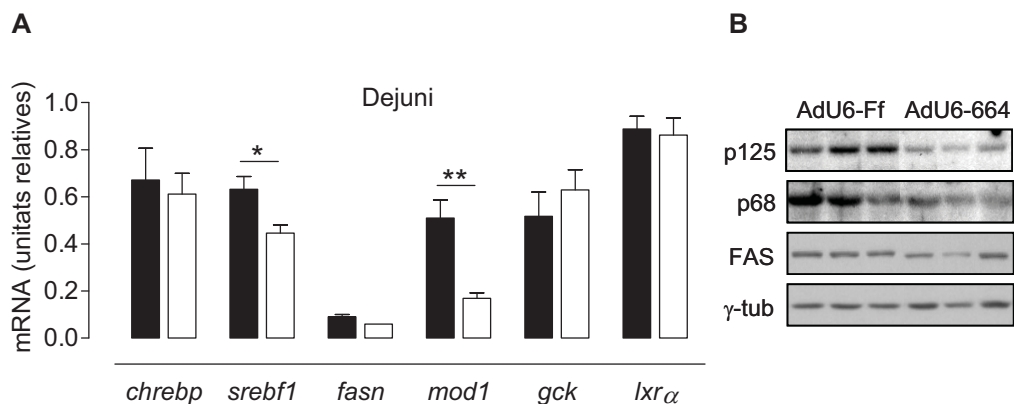


localitzada al nucli, de SREBP-1c disminueix en un 65% i un 60% respectivament segons demostra l'anàlisi densitomètric de les membranes (Figura 61 B i C).

De forma paral·lela, l'expressió gènica i el contingut proteic dels enzims regulats per aquests factors de transcripció, implicats de forma directa o indirecta en la lipogènesi, es manté inalterada (és el cas de la Sintasa d'àcids grassos (Fasn), la glucoquinasa (Gck), piruvat quinasa (L-PK) o acetil-CoA carboxilasa (ACC)) o fins i tot es redueix sensiblement (és el cas de l'Enzim Màlic (Mod1)) (Figura 61 A). Aquest patró d'expressió descartaria, en principi, que l'activació de la lipogènesi de novo.

El malonil-CoA és un important regulador de les vies de  $\beta$ -oxidació i síntesi d'àcids grassos, actuant de forma dual com a inhibidor al·lostèric de CPT-1 (de, pas limitant de la  $\beta$ -oxidació) i substrat de FAS (29). Un increment en el contingut de malonil-CoA en aquests fetges (Taula 15), seria suggestiu d'un increment en la lipogènesi. No obstant, l'enzim responsable de la seva síntesis, ACC, no semblava tenir una major activitat, ja que el seu contingut proteic al fetge i el nivell de fosforilació, que en determina la inactivació de l'enzim, es mantenen estables (Figura 61 B i C).

En dejuni, el patró relatiu d'expressió de gens lipogènics resulta equivalent al descrit al d'alimentació, amb la salvetat de que els nivells de LXR $\alpha$  no varien entre els dos grups experimentals (Figura 62).

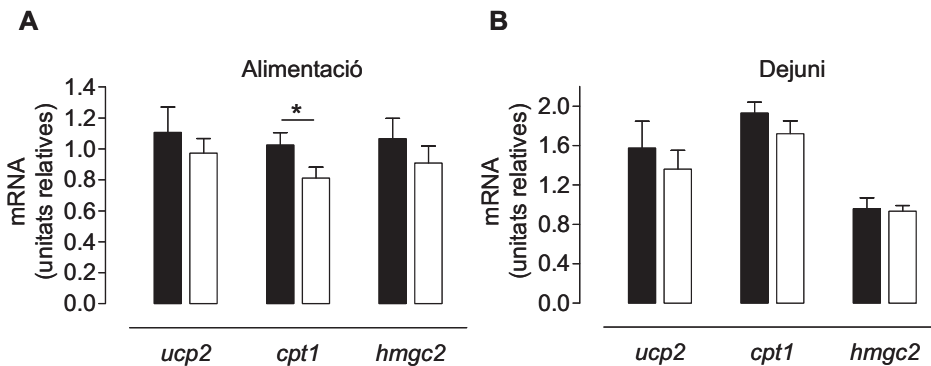


**Figura 62. La silenciació de PEPCK-C als fetges dels ratolins db/db no activa la lipogènesi.** **A:** L'expressió d'alguns gens rellevants en la lipogènesi es va analitzar en fetges obtinguts d'animals dejenats durant una nit, catorze dies després de la infecció amb AdU6-Ff (n=10; columnes negres) o AdU6-664 (n=11; columnes blanques). Els valors representen la mitja de cada grup relativa a la mitja del grup control AdU6-Ff en alimentació  $\pm$  SE, n=5, \*p<0.05, \*\*p<0.01; test t de Student. **B:** Addicionalment, es va analitzar per Western blot el contingut SREBP-1c i FAS en extractes hepàtics de ratolins dejenats durant la nit prèvia al sacrifici.

El conjunt de dades, per tant, descarten la inducció de lipogènesi de novo com a conseqüència de la silenciació parcial de PEPCK-C al fetge dels ratolins db/db. Segons això, l'acumul de lípids, sobretot d'àcids grassos, en aquests fetges hauria de tenir necessàriament un altre origen com, per exemple, un increment en l'import o un descens en la utilització d'àcids grassos ( $\beta$ -oxidació).

### $\beta$ -oxidació

El pas limitant en la  $\beta$ -oxidació és el transport dels acil-CoA de cadena llarga del citoplasma a la matriu mitocondrial, pas catalitzat pel transportador d'àcids grassos de la membrana mitocondrial externa carnitina-palmitoil transferasa-1 (CPT-1), el mRNA del la qual es veu disminuït lleugerament en el grup AdU6-664 en alimentació, però no en dejuni (Figura 63). A més, l'inhibidor al·lostèric de CPT-1, malonil-CoA, tendeix a acumular-se en aquest grup en alimentació (Taula 15), suggerint una tendència a la inhibició de la  $\beta$ -oxidació.



**Figura 63. Homeòstasi energètica en els fetges en resposta a la silenciació de PEPCK-C.** L'expressió de gens rellevants implicats en la funció mitocondrial (*Ucp2*, *Cpt1*, *Hmgc2*) es va analitzar en fetges obtinguts catorze dies després de la infecció amb AdU6-Ff (n=10; columnes negres) o AdU6-664 (n=11; columnes blanques) d'animals alimentats (A) o dejunats durant la nit prèvia al sacrifici (B). L'expressió gènica es va quantificar per RT-PCR quantitativa en un sistema 7900HT Micro Fluidic Card d'Applied Biosystems i les dades es van analitzar fent el càlcul de  $\Delta\Delta Ct$  utilitzant el gen de la  $\beta$ -2-microglobulina com a normalitzador. Els valors representa la mitja de cada grup relativa a la mitja del grup control (AdU6-Ff) en alimentació  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$ , test t de Student.

En contraposició, es van trobar diversos indicis en contra d'un possible bloqueig de la  $\beta$ -oxidació:

1. En primer lloc, el contingut proteic al fetge de PGC-1 $\alpha$ , co-activador clau implicat en la regulació de la gluconeogènesi i la  $\beta$ -oxidació, es manté constant (Figura 53 B), tot i mostrar una expressió gènica lleugerament disminuïda en alimentació (Figura 53 A).

2. En segon lloc, el contingut sèric de cossos cetònics (que provenen indirectament de la  $\beta$ -oxidació) tendeix a incrementar, tant en alimentació com en dejuni (Taula 12).
3. A més, l'expressió gènica de HMG-CoA Sintasa (codificada per Hmgc2), implicada en la síntesi de cossos cetònics, roman inalterada (Figura 63).
4. Finalment, hi ha un increment significatiu del contingut hepàtic de propionil-CoA, intermediari de la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos de cadena imparell (Taula 15).

Globalment, el conjunt de dades obtingudes suggereixen que la  $\beta$ -oxidació no està afectada significativament als fetges dels ratolins diabètics db/db com a conseqüència de la silenciació parcial de PEPCK-C. No obstant, podria haver-hi una inhibició al·lostèrica sobre CPT-1 exercida pel malonil-CoA, que limitaria el transport dels àcids grassos de cadena llarga cap al mitocondri per a ser oxidats.

### **Funció mitocondrial**

La respirometria d'alta resolució és una tècnica que mesura el consum d'oxigen en una suspensió cel·lular o de mitocondris a temps real en presència de diferents substrats i/o drogues, tal i com es descriu a l'apartat Material i Mètodes. L'aplicació d'aquesta tècnica sobre hepatòcits frescos aïllats dels ratolins tractats ens va permetre analitzar la seva funció mitocondrial, per tal de confirmar si la  $\beta$ -oxidació podria estar limitada per la capacitat mitocondrial. Les mesures corresponents als diferents estats mitocondrials que es van mesurar són:

**RUTINA:** respiració en medi gluconeogènic en presència d'octanoat com a substrat d'oxidació. L'octanoat és un àcid gras de cadena curta que entra al mitocondri independentment de CPT-1, per tant aquesta mesura de respiració és independent de la capacitat de transport d'àcids grassos cap a l'interior del mitocondri.

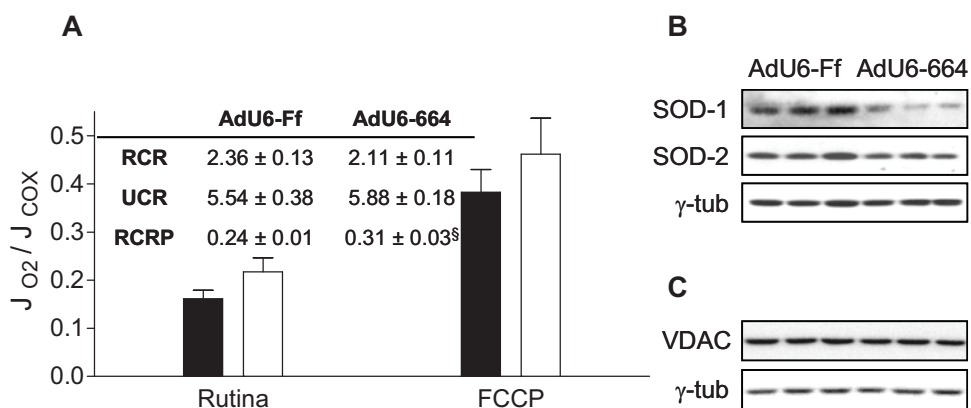
**FCCP:** respiració totalment desacoblada. Correspon a la màxima capacitat respiratòria.

A partir de les dades de la respirometria, es van calcular diferents coeficients respiratoris (227):

Relació de control respiratori (**RCR**): és un indicador de la quantitat de respiració desacoblada. Es calcula fent el quocient entre la respiració totalment desacoblada (FCCP) i la respiració en presència d'oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa.

Relació de control desacoblat (**UCR**): és una estimació de la capacitat respiratòria de reserva que es calcula com el quocient entre FCCP i RUTINA.

Relació de control de la fosforilació respiratòria (**RCRP**): ens indica la proporció de capacitat respiratòria aplicada a la síntesi d'ATP, i es calcula com a la diferència entre la respiració amb oligomicina i la respiració rutina i dividint per la respiració FCCP.



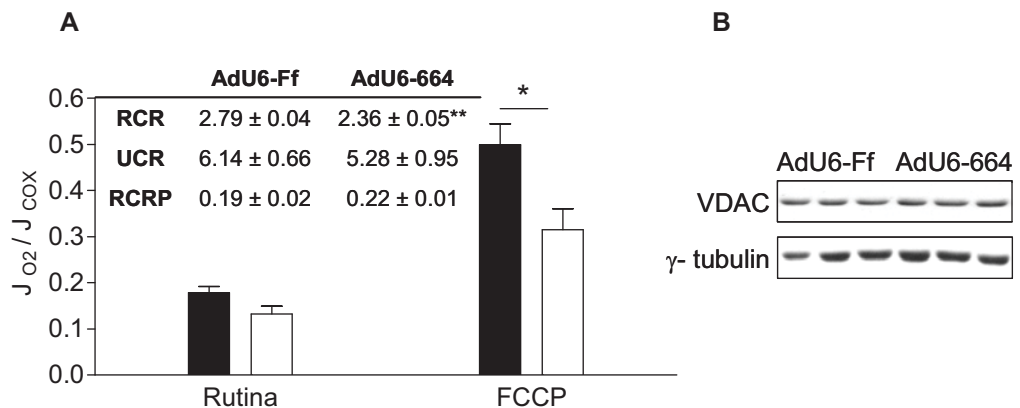
**Figura 64. La funció mitocondrial es manté íntegra en fetges amb una reducció parcial de PEPCK. A:** Catorze dies després de la infecció amb AdU6-Ff (columnes negres) o AdU6-664 (columnes blanques) es van aïllar els hepatòcits, amb els quals es va assajar la respiració tal i com es descriu als Materials i mètodes. L'activitat citocrom c oxidasa (COX) ( $J_{COX}$ ) es va utilitzar per a normalitzar les mesures de respiració. Les dades són les mitges ± ES (n=5);  $§p=0,06$ . **B:** Detecció per Western blot del contingut proteic al fetge de la forma citosòlica (SOD-1) i mitocondrial (SOD-2) de la superòxid dismutasa. **C:** Detecció per Western blot del contingut proteic al fetge del transportador d'ADP de la membrana mitocondrial interna VDAC. Es mostren membranes representatives.

La respiració en presència d'octanoat com a substrat de  $\beta$ -oxidació (Rutina) no es veia alterada per la silenciació de PEPCK-C (Figura 64 A). A més, tant la capacitat màxima respiratòria (FCCP) com el contingut del transportador d'ADP de la membrana mitocondrial interna VDAC, que es va prendre com a indicador de la quantitat de cadenes respiratòries, es mantingueren constants (Figura 64 C), suggerint que el knock-down de PEPCK-C no bloqueja el cicle de Krebs, íntimament lligat a l'activitat de la cadena respiratòria, no afecta negativament la biogènesi mitocondrial, ni tampoc limita la capacitat oxidativa d'àcids grassos independent del transport a la mitocondria. Tampoc es van trobar acúmuls dels intermediaris del cicle de Krebs, com ara acetil-CoA i succinil-CoA (Taula 15), esperables en cas que hi hagués un bloqueig del cicle.

La superòxid dismutasa (SOD), enzim que s'acumula enfront a senyals d'estrès oxidatiu, presentava un patró d'expressió de les formes citosòlica (clarament disminuïda) i mitocondrial (estable) compatible amb un increment de l'oxidació peroxisomal (228) (Figura 64 B). Addicionalment, els paràmetres calculats a partir de la respirometria (RCR i UCR) no variaven en resposta al tractament AdU6-664 (Figura 64 A, quadre intern). Finalment, en correlació amb l'índex UCR sostingut i la clara tendència a incrementar de l'índex RCRP, el nivell d'expressió de la proteïna desacobladora 2 (Ucp2) no incrementà (Figura 63 A).

El conjunt de dades descarta el bloqueig del cicle de Krebs i el desacoblament de la respiració mitocondrial com a conseqüència de la silenciació parcial de PEPCK-C.

En clara contraposició, la respirometria en hepatòcits amb una silenciació quasi total de PEPCK-C aconseguida amb la infecció dels ratolins db/db amb la dosi alta (Figures 43 i 44), mostrà una clara afectació de la capacitat respiratòria màxima (Figura 65), mentre que el número de cadenes respiratòries es mantingué, tal i com ens estaria indicant el contingut de VDAC. Aquestes dades ens apuntarien a que una supressió total o quasi-total de PEPCK al fetge dels ratolins db/db sí que podria tenir un efecte bloquejant sobre el cicle de Krebs, compromentent la respiració mitocondrial.



**Figura 65. La funció mitocondrial es veu alterada en fetges amb una reducció total de PEPCK. A:** Catorze dies després de la infecció dels ratolins db/db, amb la dosi alta ( $13.34 \cdot 10^{10}$  p.f.u./Kg) d'AdU6-Ff (columnes negres) o AdU6-664 (columnes blanques) es van aïllar els hepatòcits per perfusió del fetge i es va assajar la respiració tal i com es descriu als Materials i mètodes. Les dades són les mitges  $\pm$  ES (n=5); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Test t de Student. **B:** Contingut proteic del transportador d'ADP de la membrana mitocondrial interna VDAC, mesurat per Western blot realitzat sobre extractes totals dels fetges.

### **Càrrega energètica cel·lular**

És acceptat que la gluconeogènesi depèn de l'oxidació d'àcids grassos com a font d'energia. Un desplaçament de l'equilibri entre aquestes dues vies podria, teòricament alterar la càrrega energètica cel·lular, excepte que alguna altra via consumeixi o produeixi energia per a compensar el desequilibri. Els resultats presentats fins al moment, demostren una clara baixada en la via gluconeogènica i en la producció hepàtica de glucosa, mentre que l'oxidació mitocondrial d'àcids grassos no sembla estar alterada significativament. Com a conseqüència, i corroborant aquesta hipòtesi, la càrrega energètica cel·lular (CEC) s'incrementà considerablement en els fetges dels animals tractats amb AdU6-664, reflex d'una reducció d'un 25% en el contingut d'AMP concomitant a un increment del 50% en el contingut d'ATP, cosa que suposa que es dupliqui la relació ATP/AMP (Taula 14). Això explicaria la manca d'activació d'AMPK (Figura 66 C) i els nivells de fosforilació sostinguts d'ACC (Figura 61 B), substrat directe d'AMPK.

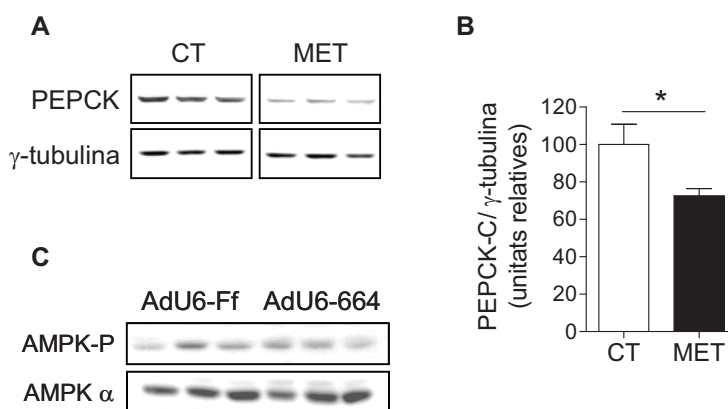
### **Mecanisme proposat**

Però, com s'ha orquestrat aquest nou panorama metabòlic en resposta a la reducció d'un únic enzim? Dues possibilitats s'analitzen a continuació:

### **Activació d'AMPK**

La metformina, fàrmac d'elecció per pacients diabètics, actua a nivell molecular bloquejant el complex I de la cadena de transport d'electrons (48), fet que desemboca en una disminució del quocient ATP/AMP, i culmina en l'activació de la quinasa dependent d'AMP (AMPK) (50). La AMPK actua com a sensor energètic cel·lular activant les vies de producció d'ATP i reprimint les vies anabòliques (32). En la diabetis, la AMPK s'ha proposat com el mediador de l'efecte hipoglucemiàtic de la metformina a través de la reducció de la gluconeogènesis hepàtica i també de l'increment de la  $\beta$ -oxidació a múscul i fetge (50). Tenint això en compte, no ens ha de sorprendre que, en resposta al tractament oral de metformina, observem una disminució en el contingut proteic de PEPCK-C als fetges, tal i com posa de manifest el Western blot mostrat a la figura 66 A. La quantificació densitomètrica d'aquests blots (Figura 66 B) mostra que la reducció de la proteïna és d'aproximadament un 30% ( $100 \pm 12.04$  vs  $72.57 \pm 4.88$ ,  $n=3$ ,  $p < 0.05$ ). En canvi, la reducció de PEPCK-C hepàtica mitjançant RNAi no s'acompanyà d'una activació d'AMPK (Figura 66 C). Per tant, en el nostre model, AMPK no

semblaria estar mediant els efectes de la silenciació hepàtica de PEPCK-C sobre l'homeòstasi de la glucosa. A més, el quocient ATP/AMP al fetge dels ratolins tractats amb AdU6-664 es veu incrementat per la suma de dos factors: a) el contingut hepàtic d'ATP incrementa; i b) el contingut hepàtic d'AMP disminueix (Taula 14). No obstant, l'increment del quocient ATP/AMP, tampoc suposà una disminució en l'estat de fosforilació d'AMPK en aquests fetges. Aquest fet podria ser degut a que els nivells detectats corresponen al seu estat basal, ja que estem analitzant fetges en alimentació



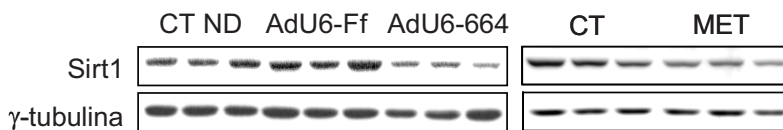
**Figura 66. Divergència entre el mecanisme molecular de la metformina i la silenciació específica de PEPCK-C hepàtica sobre l'homeòstasi de la glucosa. A:** Ratolins db/db van ser tractats amb una dosi oral de 400 mg/Kg dia de metformina (MET) administrada a través de l'aigua de beguda. Al grup control (CT) se'ls va administrar aigua sense additius. Al final del període de tractament els animals van ser sacrificats en alimentació. El contingut de PEPCK-C als fetges es va analitzar per Western blot (n=5). **B:** Quantificació densitomètrica dels blots. Les dades representen les mitges  $\pm$  ES. **C:** L'activació d'AMPK als fetges dels ratolins db/db tractats amb AdU6-Ff o AdU6-664 es va estimar analitzant, per Western blot, la relació entre la forma fosforilada d'AMPK (AMPK-P Thr<sup>172</sup>) i el contingut total de la proteïna. Es mostren membranes representatives de tres experiments independents.

### Regulació negativa de Sirt 1 mediada per senyals metabòliques

El recent treball de Rodgers i col·laboradors (80) ha posat de manifest aspectes clau de la regulació de la via gluconeogènica. En dejuni, una senyal nutricional codificada per substrats gluconeogènics com el piruvat, incrementa el contingut de Sirt1. Sirt1 és una deacetilasa depenent de NAD<sup>+</sup>, que interacciona i deacetila PGC-1 $\alpha$ , potenciant la capacitat de coactivar HNF4- $\alpha$ , factor necessari per a PGC-1 $\alpha$  per a activar la transcripció dels gens gluconeogènics (72). Altres estudis proposen Sirt1 com a regulador positiu de l'activitat transcripcional de FOXO1 (81-83; 229). Més recentment s'ha descrit el mecanisme de regulació de la transcripció de Sirt1 (230). Els autors han descrit un

mecanisme a través del qual el NADH estabilitza el complex co-repressor HIC1:CtBP que bloqueja la transcripció de Sirt1. De forma global, Sirt1 sembla funcionar com a sensor nutricional en resposta a les fluctuacions dels nivells de NADH cel·lular i actua com a modulador positiu de la gluconeogènesi.

Per tal d'avaluar si Sirt1 podria estar implicat en la regulació negativa coordinada de la gluconeogènesi descrita en el nostre model, vam analitzar els nivells de Sirt1 hepàtics. Es va detectar un evident descens en la immunodetecció de Sirt1 (Figura 67), corresponent al 50%, segons la quantificació densitomètrica de les membranes ( $100 \pm 9.16$  vs  $47.03 \pm 10.19$ ;  $n=7$ ;  $***p<0.001$ ; test t de Student). A més, els resultats mostrats a la figura 67 demostren que els nivells de Sirt1 al fetge dels ratolins no diabètics de la soca C57Bl (CTND) són sensiblement inferiors als nivells detectats als ratolins diabètics originaris de la mateixa soca (db/db), suggerint un hipotètic paper de Sirt1 en la fisiopatologia diabètica en fetge no descrit fins al moment. El fet que en un fetge diabètic hi hagi nivells incrementats de Sirt1 és coherent amb el seu paper pro-gluconeogènic al fetge (80; 231).



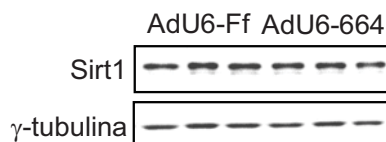
**Figura 67. Contingut de Sirt-1 hepàtica en alimentació.** El contingut hepàtic de Sirt1 es va analitzar per Western Blot en ratolins sans de la soca C57Bl (CT ND) i en ratolins diabètics db/db control (CT), tractats amb una dosi oral de metformina de 400 mg/Kg dia, o en ratolins diabètics db/db catorze dies després de la infecció amb la dosi intermitja d'adenovirus control (AdU6-Ff) o codificant pel shRNA per la PEPCK-C (AdU6-664).

De forma paral·lela al que s'ha observat als animals tractats amb el shRNA contra PEPCK-C, als fetges dels ratolins db/db tractats amb metformina, el contingut proteic de Sirt1 també es veu disminuït qualitativament, quasi un 40% respecte dels animals control ( $100.0 \pm 11.0$  vs  $63.0 \pm 9.8$ ;  $n=3$ ;  $*p<0.05$ ). Aquesta dada és suggestiva de que la modulació de Sirt1 en resposta a metformina podria estar mediant la coneguda regulació negativa que el fàrmac exerceix sobre la gluconeogènesi, i en concret, sobre la PEPCK (Figura 66). Un estudi més profund sobre els efectes de la metformina sobre Sirt1 en fetge serien pertinents per a aclarir aquest punt.

A més, vàrem observar que l'efecte sobre els nivells de Sirt1 intracel·lulars eren específics de fetge. Tal i com es mostra a la figura 68, al múscul esquelètic no es van trobar variacions en els nivells de

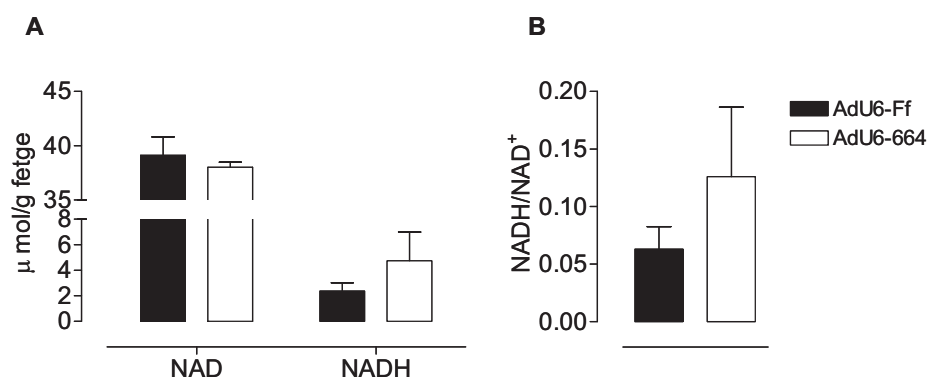


Sirt1 entre els ratolins tractats amb l'adenovirus control (AdU6-Ff) i els ratolins infectats amb l'adenovirus codificant pel shRNA contra la PEPCK-C (AdU6-664).



**Figura 68. Nivells de Sirt1 al múscul de ratolins db/db.** El contingut muscular de Sirt1 es va analitzar per Western Blot realitzats amb extractes d'una barreja de Soleus i Gastrocnemius, obtinguts de ratolins db/db catorze dies després de la infecció amb la dosi intermitja d'adenovirus control (AdU6-Ff) o codificant pel shRNA per la PEPCK-C (AdU6-664).

Com s'ha esmentat anteriorment, Sirt1 està regulat transcripcionalment en funció dels nivells de NADH intracel·lulars, de manera que nivells incrementats de NADH comporten una menor taxa de transcripció de la deacetilasa (230). Vàrem voler avaluar la possibilitat de que, en resposta al menor flux de la via gluconeogènica als fetges on la PEPCK-C havia estat silenciada, i en absència de limitacions en la  $\beta$ -oxidació, els nivells de NADH cel·lular estiguessin augmentats. Si fos així, aquest fet podria constituir una explicació a la baixada en el contingut hepàtic de Sirt1 observada. Resultats preliminars mostren, efectivament, una tendència a l'increment en el contingut de NADH i en la relació NADH/NAD<sup>+</sup> als fetges tractats amb el shRNA contra la PEPCK-C (Figura 69).



**Figura 69. Contingut hepàtic de NAD<sup>+</sup> i NADH.** **A:** El contingut de NAD<sup>+</sup> es va mesurar mitjançant mètodes fluoromètrics en fetges obtinguts de ratolins db/db alimentats als catorze dies de la infecció amb la dosi intermitja d'adenovirus. El contingut de NADH es va calcular a partir de les concentracions de Lactat/Piruvat calculades per mètodes fluoromètrics. **B:** La relació NADH/NAD és superior, tot i que no significativament, en els animals tractats amb AdU6-664,  $p=0.15$  segons un test t de Student amb una cua (n=3-4).

**Taula 12. Perfil metabòlic sèric dels ratolins db/db després de la silenciació parcial de la PEPCK-C hepàtica.**

Els sèrums van ser obtinguts 14 dies després de la infecció en ratolins alimentats, o dejunats durant tota la nit.

		Sèrum					Colesterol	
		AG (mM)	TAG (mg/dl)	β-HBA (mM)	GPT (U/l)	Colesterol (mg/dl) (total)	Colesterol (mg/dl) (HDL)	
<b>Alimentació</b>								
<b>AdU6-Ff</b>		0.92 ± 0.05	174.75 ± 12.61	0.22 ± 0.05	144.00 ± 11.46	116.53 ± 3.16	60.86 ± 5.23	
<b>AdU6-664</b>		0.78 ± 0.04	117.83 ± 12.61 *	0.29 ± 0.04	150.82 ± 4.99	133.27 ± 4.60 **	74.93 ± 4.75 *	
<b>Dejuni</b>								
<b>AdU6-Ff</b>		0.89 ± 0.08	134.50 ± 11.05	0.40 ± 0.05	253.33 ± 17.99	104.85 ± 3.06	n.d.	
<b>AdU6-664</b>		0.58 ± 0.02	86.00 ± 7.14	0.66 ± 0.08	205.67 ± 5.27	132.85 ± 2.07 #	n.d.	

Les dades representen les mitges ± ES. n = 13-16 (AdU6-Ff) i n=15-18 (AdU6-664), \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 vs tractament amb el virus control en els experiments en alimentació; n=6 (AdU6-Ff and AdU6-664), #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001 vs tractament amb el virus control als experiments en dejú; test t de Student. n.d.; no determinat

**Taula 13. Perfil metabòlic hepàtic dels ratolins db/db després de la silenciació parcial de la PEPCK-C hepàtica.**

Els fetges van ser obtinguts 14 dies després de la infecció en ratolins alimentats, o dejunats durant tota la nit.

		Fetge		
		Glicogen (mM/g)	TAG (mg/g)	AG (mmol/g)
<b>Alimentació</b>	<b>AdU6-Ff</b>	273.41 ± 31.34	117.37 ± 15.20	0,48 ± 0,28
	<b>AdU6-664</b>	296.74 ± 18.65	173.39 ± 11.43 **	1,68 ± 0,45 *
<b>Dejuni</b>	<b>AdU6-Ff</b>	70.18 ± 3.33	43.94 ± 4.75	2.30 ± 0.21
	<b>AdU6-664</b>	19.41 ± 3.69 ###	107.05 ± 11.24 ###	4.01 ± 0.27 ###

Les dades representen les mitges ± ES. n= 13-16 (AdU6-Ff) i n=15-18 (AdU6-664),\* p < 0.05, \*\* p < 0,01 vs tractament amb el virus control en els experiments en alimentació; n=6 (AdU6-Ff and AdU6-664), #p < 0.05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 vs tractament amb el virus control als experiments en dejú; test t de Student.

**Taula 14. Contingut en nucleòtids als fetges dels ratolins db/db.**

El fetge va ser obtingut 14 dies després del tractament amb l'adenovirus recombinant.

	<b>AMP</b> ( $\mu\text{mol/g}$ )	<b>ADP</b> ( $\mu\text{mol/g}$ )	<b>ATP</b> ( $\mu\text{mol/g}$ )	<b>CEC</b>	<b>ATP/AMP</b>
<b>AdU6-Ff</b>	1.05 $\pm$ 0.06	1.24 $\pm$ 0.08	1.02 $\pm$ 0.08	0.47 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.12
<b>AdU6-664</b>	0.77 $\pm$ 0.11 *	1.16 $\pm$ 0.07	1.47 $\pm$ 0.17 **	0.54 $\pm$ 0.02 **	2.28 $\pm$ 0.51**

Càrrega energètica cel·lular ( $\text{CEC} = (\text{ATP} + 1/2 \text{AMP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$ )

Les dades representen les mitges  $\pm$  ES. n=8; \* p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs tractament amb el virus control; test t de Student

**Taula 15. Contingut d'acil-CoA de cadena curta als fetges dels ratolins db/db.**

El fetge es va obtenir 14 dies després del tractament amb l'adenovirus recombinant.

	<b>Acetil-CoA</b> (nmol/g)	<b>Propionil-CoA</b> (nmol/g)	<b>Succinil-CoA</b> (nmol/g)	<b>Malonil-CoA</b> (nmol/g)
<b>AdU6-Ff</b>	140.13 ± 1.95	48.12 ± 0.84	31.44 ± 3.12	2.079 ± 0.239
<b>AdU6-664</b>	130.29 ± 2.47	56.68 ± 1.25**	31.31 ± 2.10	4.472 ± 0.932*

Les dades representen les mitges ± ES. n=8; \* p < 0.05. \*\*p < 0.01 vs tractament amb el virus control; test t de Student

---

## DISCUSSIÓ

---

### **Control de la glucèmia a través de l'activitat PEPCK-C hepàtica**

De forma similar al descrit al Capítol I en un model de ratolí diabètic tipus I, la reducció parcial de PEPCK-C hepàtica (d'un 50% aproximadament), en aquest cas en un model de ratolí diabètic tipus II, comporta una clara millora en l'homeòstasi de la glucosa. La capacitat hipoglucemiant en alimentació daquest tractament és similar al d'un tractament amb metformina, un dels fàrmacs hipoglucemiants més emprats en la clínica per al tractament de la diabetis tipus II. No obstant, tot i que la reducció parcial de PEPCK-C té un clar efecte sobre la producció hepàtica de glucosa a partir de piruvat, no suposa un efecte hipoglucemiant en dejú. En canvi, sí que s'observà un efecte hipoglucemiant en dejú quan la silenciació de PEPCK-C en fetge és quasi-absoluta (aproximadament d'un 90%). D'altra banda, els nivells de glicogen hepàtic es mantenen constants en alimentació, però disminueixen en dejú, en resposta a la silenciació parcial de PEPCK-C. Aquest conjunt de dades podria estar indicant que, probablement, hi ha un efecte compensatori per part de la glicogenòlisi hepàtica per a compensar la reducció en la gluconeogènesi, compensant la producció hepàtica de glucosa i la glucèmia en dejú. De fet, la reducció en un 90% de la PEPCK-C redueix significativament la els nivells de glicogen hepàtic en alimentació, suggerint d'una banda, una taxa de glicogenòlisi insuficient per a compensar la reducció de gluconeogènesi en dejuni, i de l'altra, una síntesi de glicogen per la via indirecta reduïda, conseqüència de l'absència de PEPCK-C. Podriem concloure, per tant, que l'activitat PEPCK-C té un rol preponderant en el control de la glucèmia.

### **La silenciació de PEPCK-C hepàtica millora la sensibilitat a la insulina als ratolins db/db**

Diverses observacions evidencien un efecte positiu sobre la sensibilitat perifèrica a la insulina derivat, directa o indirectament, de la silenciació hepàtica de PEPCK-C en els ratolins db/db:

1. Una clara millora en la tolerància a glucosa i en la insulinèmia en dejuni.
2. La reducció del índex IR, càlcul teòric de l'índex de resistència a insulina.
3. La major captació de glucosa en resposta a insulina observada a l'assaig de tolerància a la insulina (IPITT)
4. La capacitat superior d'activar la via de senyalització de la insulina, no només a fetge, sinó també a teixits perifèrics.

5. Una millora dels símptomes clínics de la diabetis, sobretot en la poliúria i glucosúria.

Aquesta millora en la sensibilitat a insulina pot tenir diferents orígens:

1. Una menor insulinèmia secundària a la reducció de la glucèmia.

El pes específic de la glucotoxicitat vs. la lipotoxicitat sobre la insulinèmia i la resistència a la insulina al fetge i als teixits perifèrics no està del tot clara. En alguns models transgènics de diabetis tipus II la hiperglucèmia sembla tenir un efecte directe sobre la sensibilitat a insulina del fetge i els teixits perifèrics (232), mentre que en d'altres, la reducció de la hiperglucèmia no va acompanyada d'una reducció de la insulinèmia ni de la millora de la resistència a insulina, suggerint un efecte majoritari de la lipotoxicitat sobre la resistència a insulina (233). El tractament dels ratolins db/db amb flordizina, agent hipoglucèmiat que inhibeix la captació intestinal i la reabsorció renal podria ajudar a dilucidar si la reducció de la glucèmia per se té un efecte sobre la insulinèmia i la sensibilitat a insulina en aquest model animal. No obstant, estudis similars demostren que el tractament de ratolins db/db amb una dosi de 400 mg/Kg de flordizina durant un període de dues setmanes, tot i normalitzar la glucèmia, tant en alimentació com en dejú, no restaura la insulinèmia (234), descartant un efecte directe de la hiperglucèmia sobre la insulinèmia en els ratolins db/db. Per tant, la millora de la insulinèmia i la sensibilitat a insulina als ratolins db/db tractats amb AdU6-664 no sembla ser conseqüència directa de la reducció de la glucèmia, encara que, la implicació de la millora de la dislipidèmia sobre la sensibilitat a la insulina no es pot descartar.

2. La intercomunicació entre el fetge i el cervell a través del nervi vague (59).

Aquesta via s'ha proposat com a via responsable de coordinar el metabolisme energètic dels òrgans perifèrics en resposta a l'estat del metabolisme energètic del fetge. Aquesta via de comunicació coordinada a nivell de l'hipotàlam (Figura 8) pot arribar a modular la sensibilitat sistèmica a la insulina, en resposta a la modulació del metabolisme energètic en fetge (61; 62). Si aquesta hipòtesi fos certa en el nostre model de ratolí db/db, els efectes sistèmics descrits en resposta a la silenciació parcial de PEPCK-C s'anul·larien si els animals fossin sotmesos a una vagotomia hepàtica o una disrupció de les fibres vagals aferents.

## **La lipidosi hepàtica secundària a la silenciació de PEPCK-C no induïx resistència a la insulina**

Una observació que a priori podria semblar contradictòria és la millora de la sensibilitat a insulina a fetge tot i l'acumulació de Acil-CoA i TAG a fetge. La lipidosi hepàtica s'associa generalment a la inducció de resistència a insulina, tot i que la relació causal entre els dos fenòmens no està clara. D'una banda, sembla clar que la resistència a insulina condueix a esteatosi hepàtica: la resistència a insulina sol anar acompanyada d'hiperinsulinèmia i hiperglucèmia, que poden activar les vies de senyalització que activen la síntesis de lípids (Figura 1). Però, de l'altra, la hipòtesi que la esteatosi per se sigui suficient per a causar resistència a insulina, està sotmeta a debat. Diferents espècies lipídiques (acil-CoA de cadena llarga, diacilglicerol, ceramides) poden actuar com a segons missatgers en la inducció de resistència a insulina en el teixit (235; 236). Recentment s'ha descrit que la resistència a insulina en fetge associada a lipidosi hepàtica no està necessàriament mediada per l'acumulació d'àcids grassos o triacilglicerol (TAG) (26; 237), sinó que és una espècie lipídica derivada, el diacilglicerol (DAG), la que induïx resistència a insulina a través de l'activació de la serina/treonina kinasa PKC $\epsilon$ . Un cop activada, PKC $\epsilon$  transloca a la membrana, on s'uneix i inhibeix l'activitat tirosina-kinasa del receptor d'insulina, bloquejant així la via de senyalització d'insulina (25). Als fetges dels ratolins db/db on PEPCK-C s'ha silenciado parcialment, tot i la l'acumulació de TAG i AG, podem descartar la inducció de resistència a insulina en base a tres observacions:

1. Una major fosforilació d'AKT en resposta a un bolus d'insulina.
2. Una major fosforilació steady-state de FOXO1 al fetge en alimentació.
3. PKC $\epsilon$  no s'acumula a la membrana plasmàtica.

### **Origen i destí dels lípids als fetges on PEPCK-C ha estat silenciada**

Les causes de l'increment d'AG al fetge poden ser quatre:

1. Increment en la síntesis de novo.

La contribució de la lipogènesi de novo a l'acumulació de TAG i AG es va avaluar mesurant els nivells d'expressió i el contingut proteïc de diferents enzims lipogènics i factors de transcripció implicats en la seva regulació. En cap cas es va trobar indicis de que la silenciació de PEPCK-C



estigui activant la síntesi de lípids. Reguladors clau de la lipogènesi romangueren inalterats (ChREBP) o disminuïren (SREBP-1c i LXR $\alpha$ ). Addicionalment, enzims glucolítics (L-PK i GK) es mantinguéren inalterats i enzims lipogènics o bé romangéren inalterats (FAS i ACC) o disminuïren (ME). Per tant, la lipogènesi no pot estar contribuint a l'acumulació de greixos observada (Figura 70).

Algunes qüestions referents al patró d'expressió dels gens lipogènics al fetge en resposta a la silenciació de PEPCCK-C mereixen discussió:

La insulina és considerada la hormona clau en la regulació del metabolisme energètic. SREBP-1c ha emergit en els últims anys com a mediador dels efectes de la insulina sobre els gens glucolítics (GK) i lipogènics (FAS, ACC) (221). No obstant, diferents estudis mecanístics posen en dubte si els efectes reguladors de la insulina estan mediatos a través de la via de senyalització de la hormona, o a través d'altres molècules que actuen de sensors metabòlics en paral·lel a la insulina, com la glucosa. Recentment s'ha descrit que la glucosa, independentment d'insulina, pot actuar com a agonista de LXR $\alpha$ , unint-s'hi directament i incrementant-ne l'activitat transcripcional sobre els gens lipogènics SREBP-1c i ChREBP (226). LXR $\alpha$  indueix la transcripció de SREBP-1c (19) i ChREBP (18) a través d'elements de resposta a LXRE dels seus promotors. Aquests i altres treballs han aixecat certa controvèrsia, sobre si els efectes de la insulina sobre SREBP-1c són directes o mediatos a través de la modulació de l'activitat transcripcional de LXR- $\alpha$  per la glucosa.

En el nostre model hem trobat una disminució del mRNA de SREBP-1c. Aquesta disminució pot ser respondre a:

- a) la disminució dels nivells de LXR $\alpha$  observada.
- b) la disminució l'activitat transcripcional de LXR $\alpha$  conseqüència de la disminució de la glucèmia en alimentació. No obstant, SREBP-1c també es troba reduïda (tant a nivell de mRNA com de proteïna) en dejuni, tot i no haver diferències ni en l'expressió gènica de LXR $\alpha$  ni en els nivells de glucosa. Aquesta reducció només pot ser explicada per la menor insulinèmia.

No hi ha correlació entre els nivells de SREBP-1c i GK, contràriament al hom esperaria tenint en compte que SREBP-1c regula la transcripció de GK. No obstant hi ha discrepàncies respecte a la mediació de SREBP-1c en la transcripció de Gck en resposta a insulina (238; 239). Les dades aquí presentades suggereixen que l'eix LXR $\alpha$ /SREBP-1c no està controlant directament la transcripció de Gck, en correlació amb els resultats obtinguts per Mirtro et al. emprant un agonista de LXR $\alpha$  (226).

Múltiples estudis demostren que la transcripció dels gens lipogènics (ACC, FAS, etc) està regulada de forma sinèrgica pels nivells de glucosa i insulina a través de ChREBP i SREBP-1c. La regulació d'aquests gens per ChREBP requereix la metabolització de la glucosa per GK (17). El manteniment dels nivells de GK i ChREBP, tot i la baixada de la glucèmia, podrien explicar el manteniment de FAS i ACC, malgrat la baixada de SREBP-1C.

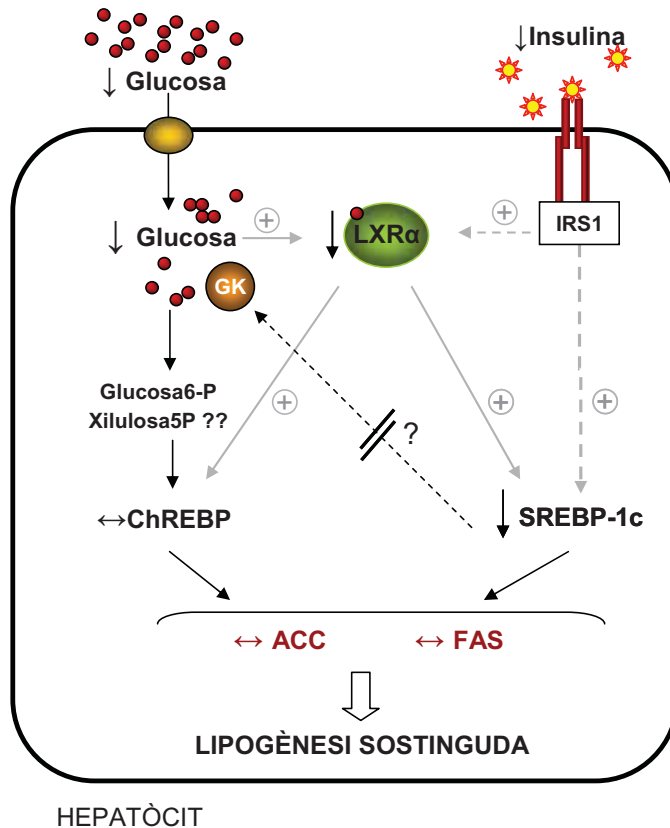


Figura 70. Mecanisme proposat per al manteniment de la lipogènesi en els fetges dels ratolins db/db on PEPCK-C s'ha silenciat. Les fletxes en gris representen una reducció de l'estímul.

2. Reducció en l'oxidació d'àcids grassos.

No es pot afirmar, amb les dades recopilades en aquest estudi, que l'oxidació d'àcids grassos en fetge incrementi, però tampoc que disminueixi quan PEPCK-C es delecta al 50% (Figura 71). Algunes consideracions al respecte es discuteixen a continuació:

D'una banda, el pas limitant en l'oxidació d'àcids grassos de cadena llarga és el transport a l'interior del mitocondri per CPT-1. La reducció en els nivells d'expressió de CPT-1, juntament amb l'increment del contingut de malonil-CoA, potent inhibidor al·lostèric de CPT-1, són evidències indirectes d'una tendència a la inhibició de l'oxidació d'àcids grassos. Una sèrie d'evidències apunten a que no hi ha tal inhibició:

a) La inhibició que el malonil-CoA exerceix sobre CPT-1 pot ser sobrepassada per l'abundància d'AG (20; 240).

b) No hem trobat un bloqueig de la respiració mitocondrial en presència d'octanoat (àcid gras de cadena intermitja que entra al mitocondri independentment de CPT-1) no es veu reduïda en els fetges en que PEPCK-C ha estat silenciada parcialment.

c) L'increment del contingut sèric de cossos cetònics i de propionil-CoA (intermediari de l'oxidació d'àcids grassos de cadena imparell) al fetge suggereixen un increment de l'oxidació d'àcids grassos.

d) El patró d'expressió de SOD1 (citosòlica) i SOD2 (mitocondrial) als fetges (disminució i manteniment respectivament) és suggestiu d'un increment de l'oxidació peroxisomal. Altres autors han observat el mateix patró mitjançant la inducció de l'oxidació peroxisomal amb una dosi baixa de ciprofibrat (228).

### 3. Increment en la captació d'àcids grassos des de plasma.

La gluconeogènesi és una via energèticament costosa i, per tant, una reducció en el flux de la via es reflexa en un increment en la càrrega energètica cel·lular, en aquest i altres estudis de modulació de l'activitat PEPCK-C en fetge (97). La captació dels àcids grassos de la circulació cap al fetge és un procés no regulat; la seva activació a acil-CoA, catalitzat per la acil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.3) és una reacció que consumeix ATP i genera AMP. Per tant, seria factible que, donat que en els fetges on PEPCK-C està silenciada, la relació ATP/AMP incrementa, aquest l'increment en la càrrega energètica cel·lular s'estigués invertint en la captació i activació d'àcids grassos plasmàtics, contribuint, d'una banda a la tendència a la reducció en sang i de l'altra, a la seva acumulació al fetge.



reducció parcial de l'activitat PEPCK-C al fetge podria suposar una reducció de la reesterificació d'AG i una menor síntesi i exportació de TAG en forma de VLDL (Figura 16 i 71). Consistentment, es va observar una reducció significativa dels nivells sèrics de TAG i un increment d'AG i TAG a fetge. No obstant, aquests fetges també acumulaven TAG, possiblement perquè mantenen una certa capacitat de reesterificació d'àcids grassos gràcies a la generació de glicerol-3-P a partir de glicerol. Cal recordar que els ratolins genosuprimits per Pck1 mantenen certa capacitat de producció de glucosa a partir de glicerol a través de la glicerol quinasa (96). No ens ha de passar per alt que l'augment dels TAG al fetge, juntament amb la seva disminució al sèrum és quantitativament inconsistent amb un rol unificador de la gliceroneogènesi hepàtica. Només un efecte afegit que bloquejés l'ensamblatge i l'exportació de VLDL podria justificar els resultats obtinguts. Aquest aspecte queda obert a noves investigacions, per a intentar esbrinar-ho.

Sembla ser, doncs, que l'acumulació de lípids al fetge seria multifactorial, implicant un increment de la captació de dipòsits perifèrics, una reducció de la reesterificació dels àcids grassos per a sintetitzar i una menor exportació de TAG en forma de VLDL (Figura 71).

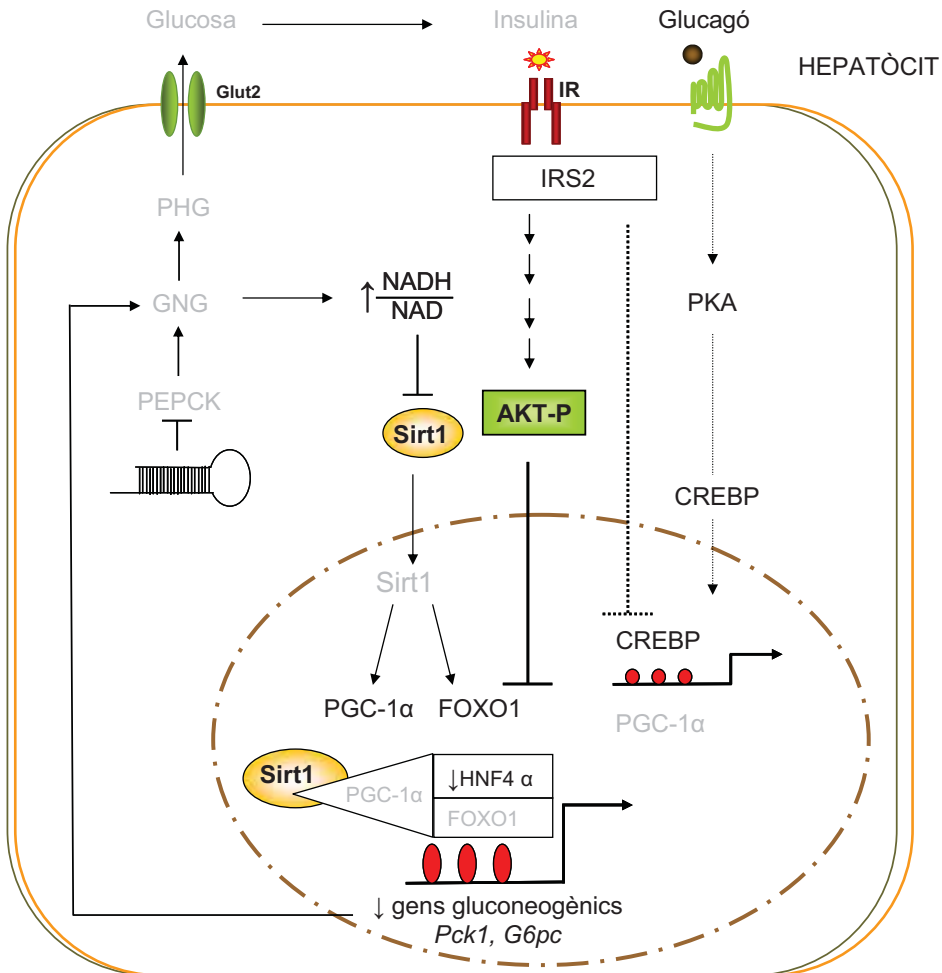
### **Regulació coordinada de la gluconeogènesi hepàtica derivada del silenciament de PEPCK-C: senyals i mediadors**

Tot el fenotip descrit deriva, directa o indirectament, d'una reducció de la capacitat gluconeogènica al fetge conseqüència de la reducció del contingut hepàtic en PEPCK-C, tal i com demostra la menor producció de glucosa a partir de piruvat. A més, l'anàlisi transcripcional és coherent amb una regulació negativa coordinada de la gluconeogènesi hepàtica. Dos mecanismes, esquematitzats a la figura 72, podrien estar regulant de forma cooperativa la via gluconeogènica, tant a nivell transcripcional com post-transcripcional:

1. Una senyal hormonal mediada per insulina.

La G6Pasa i la PEPCK-C estan regulades a nivell transcripcional per factors com HNF4- $\alpha$  i FOXO1, els quals són coactivats per PGC-1 $\alpha$ . En resposta a insulina FOXO1 és fosforilat per AKT i exclòs del nucli, reduint així la seva activitat transcripcional. Un increment molt significatiu de la fosforilació de FOXO1 en els fetges tractats suggereix que la senyalització d'insulina a través d'AKT, més eficient en aquests fetges, contribueix a la reducció dels nivells d'mRNA dels gens gluconeogènics G6pc i Pck1.

L'activitat transcripcional del complex FOXO1/PGC-1 $\alpha$ /HNF4- $\alpha$  pot estar disminuïda a través de la senyalització de la insulina, ja que l'activitat transcripcional del complex depèn de la interacció entre FOXO1 i PGC-1 $\alpha$  (74).



**Figura 72. Mecanisme proposat de disminució coordinada de la gluconeogènesi en resposta a la silenciament de PEPCK-C hepàtica.** La disminució de la transcripció de gens gluconeogènics respon a senyals metabòliques i hormonals secundàries a la reducció en la producció hepàtica de glucosa. Els mecanismes de regulació que es proposen serien tant a nivell transcripcional, com post-transcripcional. Aquests mecanismes i inclourien la deacetilació de PGC-1 $\alpha$  i FOXO1 per part de Sirt-1 i la fosforilació de FOXO1 per part d'AKT. Els paràmetres disminuïts es representen en color gris.

## 2. Una senyal metabòlica orquestrada per Sirt1.

En els últims anys, la histona deacetilasa dependent de NAD<sup>+</sup> Sirt1, ha emergit com a eix regulador de l'homeòstasi energètica. Al fetge, en estats de dejuni una senyal nutricional mediada per piruvat indueix Sirt1 a nivell transcripcional. Sirt1 interacciona i deacetila PGC-1 $\alpha$  de forma dependent de NAD<sup>+</sup> (80). La deacetilació de PGC-1 $\alpha$  als hepatòcits incrementa la seva capacitat d'interaccionar amb HNF4- $\alpha$  i activar la transcripció de gens gluconeogènics.

Estudis *in vitro* proposen un model de regulació de l'activitat transcripcional de FOXO1 basat en el seu estat d'acetilació, que estaria regulant FOXO1 de manera cooperativa juntament amb la fosforilació dependent d'AKT (83; 229). Segons aquest model, l'acetilació de FOXO1 atenua la seva capacitat d'unió al DNA, fent-lo més susceptible a la fosforilació per AKT. Pel contrari, en hepatòcits en cultiu primari, Sirt1 deacetila FOXO1, reclutant-lo al nucli i promovent així la seva activitat transcripcional sobre gens gluconeogènics com Pck1 o G6pc (81).

La reducció substancial de Sirt1 als fetges on PEPCK-C ha estat silenciada apunta cap a Sirt1 com a possible mediador d'una senyal metabòlica que modula negativament la gluconeogènesi de forma coordinada amb la insulina a través de la regulació negativa de l'activitat transcripcional de PGC-1 $\alpha$  i FOXO1. Un menor grau d'acetilació de PGC-1 $\alpha$  i FOXO1 secundari a la reducció del contingut hepàtic de la deacetilasa, podria ser el responsable de la menor taxa de transcripció dels gens gluconeogènics Pck1 i G6pc. Les dades presentades són coherents amb la hipòtesi que, a conseqüència de la reducció del contingut hepàtic de PEPCK-C, una disminució en la via gluconeogènica generés una senyal metabòlica que es traduiria en una disminució de la transcripció de Sirt1, el qual orquestraria un feed-back negatiu sobre la regulació de la gluconeogènesi (Figura 72). Aquesta senyal metabòlica possiblement seria una acumulació de NADH.

L'acumulació de NADH als fetges conseqüència d'una menor gluconeogènesi hepàtica, pot estar relacionada amb la silenciació parcial de PEPCK-C de diferents maneres:

1. Menor consum de NADH citosòlic a la reacció, normalment molt activa, catalitzada per la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH; EC 1.2.1.12).

2. Manteniment de la PHG a partir de glicerol, que podria estar generant un excés de NADH citosòlic en la reacció catalitzada per la Glicerol-3-fosfat deshidrogenasa (GPDH; EC 1.1.1.8), tal i com s'ha suggerit per als models de ratolí genosuprimit per Pck1 (96; 97).

### **Sirt1 com a mediador de senyals metabòliques en el control de la homeòstasi energètica: implicacions en la diabetis**

Els paral·lelismes entre els efectes de la silenciació parcial de PEPCK-C en els ratolins db/db i el tractament amb metformina podrien també explicar-se a través de Sirt1. El tractament d'individus diabètics amb metformina té un efecte de millora sobre la hiperglucèmia diabètica i la sensibilitat a la insulina en fetge i teixits perifèrics, a més de la reducció de la producció hepàtica de glucosa (54). No obstant, el mecanisme molecular de l'acció de la metformina sobre el fetge no es coneix en profunditat. S'ha proposat que la metformina bloqueja el Complex I mitocondrial de la cadena de transport d'electrons, i la respiració mitocondrial (48; 54). Conseqüentment, el pool intracel·lular d'ATP disminueix i la relació NADH/NAD tant citosòlica com mitocondrial incrementa (243). Aquests dos estímuls podrien ser els mediadors dels efectes de la metformina, d'una banda activant la quinasa dependent d'AMP (32; 50; 53), i de l'altra, reprimint la transcripció de Sirt1. Un increment en la relació NADH/NAD en els fetges dels ratolins db/db tractats amb metformina (MET) podria explicar la reducció en el contingut de Sirt1 que estaria orquestrant la regulació negativa de la gluconeogènesi hepàtica. Aquest mecanisme explicaria la reducció en el contingut de PEPCK-C en fetge en els ratolins db/db tractats amb la droga. No obstant, un estudi més profund sobre els efectes de la metformina sobre Sirt1 en fetge serien pertinents per a aclarir aquest punt.

Clàssicament s'ha associat Sirt1 amb l'adaptació a la restricció calòrica i longevitat (244). El seu impacte en el metabolisme energètic i en patologies metabòliques com la diabetis no ha estat estudiat en profunditat fins al moment. Els resultats obtinguts en aquest treball suggereixen que, en situacions de diabetis, Sirt1 està incrementat en fetge, en concordança amb l'activitat progluconeogènica de Sirt1 a fetge (80). Per tant, la seva reducció, secundària a la silenciació de PEPCK, contribuiria a la reducció de la gluconeogènesi hepàtica a través de PGC-1 $\alpha$  i a la sensibilització a insulina a través de FOXO1 (Figura 72).



Les discrepàncies entre els dos possibles rols oposats en diabetis de Sirt1 podrien ser degudes a diferents causes:

1. Modulació específica de teixit de Sirt1

En múscul en una situació de resistència a insulina hi ha una reducció del contingut de Sirt1 (245), mentre que en fetge, segons els resultats mostrats en el present treball, hi ha un increment.

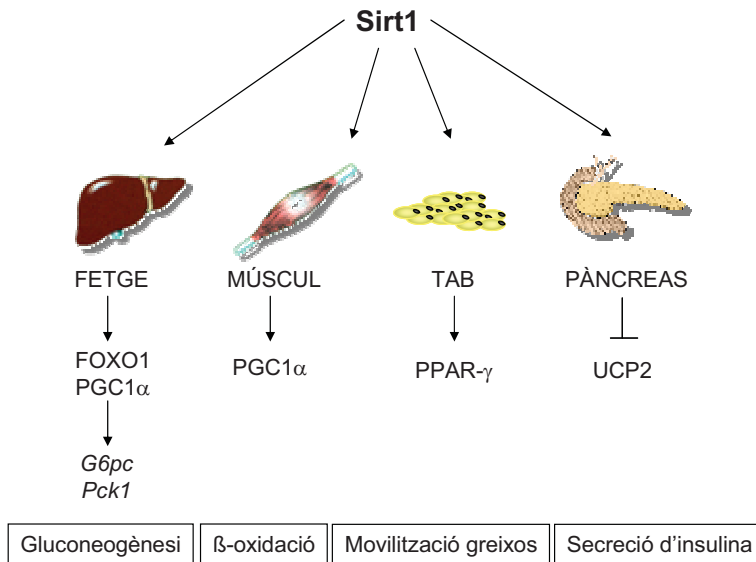
2. Efecte específic de teixit de l'activació de Sirt1

Al fetge, Sirt1 activa la gluconeogenesis en resposta a senyals nutricionals de dejuni a través de la deacetilació de PGC-1 $\alpha$  (80). En cèl·lules pancreàtiques Sirt1 regula positivament la secreció d'insulina a través de la repressió de la transcripció de Ucp2, millorant la capacitat de secreció d'insulina i la tolerància a glucosa (246). Als adipòcits, Sirt1 sembla estar implicat en la mobilització d'àcids grassos en situacions de dejuni a través de la repressió post-transcripcional de PPAR $\gamma$  (247), mentre que en cèl·lules musculars Sirt1 activa l'oxidació mitocondrial a través de la deacetilació de PGC-1 $\alpha$  (248).

L'activació de Sirt1 pel tractament amb resveratrol resulta en una menor acetilació de PGC-1 $\alpha$ , tant en múscul esquelètic com en teixit adipós i fetge; no obstant l'increment de l'expressió dels gens mitocondrials diana de PGC-1 $\alpha$  s'observa només a múscul i teixit adipós, incrementant-ne la capacitat oxidativa, fet que explica la protecció que el polifenol suposa enfront al guany de pes i a la resistència a insulina (249; 250). Al fetge, en canvi, els autors no observaren un increment dels gens diana de PGC-1 $\alpha$  (G6pc i Pck1), possiblement a causa del requeriment d'interaccions específiques de teixit amb altres co-factors (250). Aquests resultats indiquen que els efectes anti-diabètics dels activadors alostèrics de Sirt1 deriven de l'activació de la deacetilasa, no a fetge, sinó a múscul i teixit adipós.

En concordança amb el concepte de Sirt1 com a regulador pro-gluconeogènic en fetge, resultats molt recents del laboratori del Dr. Puigserver mostren que la sobreexpressió de Sirt1 en fetges de ratolins sans té un efecte hiperglicèmic i redueix la tolerància a glucosa, mentre que la seva silenciació en ratolins db/db redueix la producció hepàtica de glucosa, millora l'homeòstasi de la glucosa, la tolerància i sensibilitat a insulina i repercuteix en una acumulació d'àcids grassos en fetge (231). En

el present treball, mostrem que la silenciació parcial de PEPCK al fetge dels ratolins diabètics db/db resulta en la reducció dels contingut en Sirt1 de forma específica en fetge, no en altres teixits, com el múscul esquelètic, fet compatible amb un efecte anti-diabètic, donada la funció pro-gluconeogènica de Sirt1 a fetge (80).



**Figura 73. Possibles implicacions de Sirt1 en el metabolisme energètic.**

### 3. Efectes indirectes no dependents de Sirt1.

Els estudis amb resveratrol in vivo demostren, a més de la menor acetilació de PGC-1 $\alpha$ , un increment de la seva expressió gènica a TAB, múscul i fetge (249; 250) no explicable directament a través de l'activació alostèrica de Sirt1. Per tant una qüestió que roman sense aclarir és la especificitat d'aquests activadors alostèrics. El resveratrol és un antioxidant, capaç d'activar AMPK. Estudis recents han suggerit que el resveratrol estimula AMPK tant a cèl·lules musculars (249) com neuronals (251) en estudis in vitro. AMPK inhibeix la gluconeogènesi hepàtica i activa la  $\beta$ -oxidació hepàtica i muscular. Per tant, l'activació d'AMPK podria explicar alguns dels efectes beneficiosos del resveratrol sobre els models de dieta hipercalòrica (252). Una aproximació per a diferenciar els efectes derivats de Sirt1 i AMPK en el tractament amb resveratrol seria el tractament de models knock-out per a Sirt 1 o AMPK en fetge o múscul. Addicionalment ratolins amb una deleció específica

en múscul o fetge de PGC-1 $\alpha$  podrien determinar si els efectes d'aquests polifenols requereixen PGC-1 $\alpha$  i són únicament depenents de Sirt1.

Per tant, els resultats descrits amb els activadors alostèrics de Sirt1 i el resveratrol no són incompatibles amb els resultats mostrats en el present treball, sinó complementaris. En conjunt, aquests resultats apunten a la modulació negativa de l'activitat Sirt1, negativa a fetge i positiva a teixit adipós i múscul, com a possible diana terapèutica en una teràpia per la diabetis, i son compatibles amb l'efecte antidiabètic de la menor activitat Sirt1 en fetge descrit en el present treball (Figura 73).



---

**DISCUSSIÓ GENERAL**

---



Aquest treball té com a objectiu validar la PEPCK-C hepàtica com a diana terapèutica per a la diabetis. Per a això hem emprat emprat la tecnologia del RNA d'interferència. La reducció de l'activitat PEPCK-C al fetge dels individus diabètics hauria, en teoria, de repercutir en una menor gluconeogènesi hepàtica i en una millora en l'homeòstasi de la glucosa. A més, donades les implicacions de l'enzim en el metabolisme energètic, és d'esperar un impacte metabòlic més enllà de la glucèmia. El patró metabòlic i els possibles mecanismes implicats s'han mostrat i discutit en els capítols I i II. A continuació es discutiran, d'una banda, aspectes metodològics rellevants, i de l'altra, elements discrepants i coincidents amb el model de genosupressió descrit al laboratori del Dr. Magnuson i el Dr. Hanson.

### **Disseny de la molècula silenciadora**

En el disseny de la molècula efectora, es va emprar vectors de shRNA de 29 nucleòtids, adients per a la seva administració in vivo per diverses raons:

1. Obtenir suficient quantitat de siRNA resulta determinant en la funcionalitat de la estratègia de silenciament (220), especialment en el cas d'un gen que expressa mRNA en grans quantitats, com és el cas de Pck1 en diabetis. L'ús de vectors d'expressió de shRNA permet l'amplificació de la molècula efectora ja que, un cop a la cèl·lula diana, la transcripció proveeix d'una gran quantitat de shRNA efector.
2. Diferents estudis han demostrat que els shRNA de 29 nucleòtids (155) o els siRNA sintètics de 27 nucleòtids (154) poden ser substancialment més efectius que els shRNA o siRNA sintètics de 21 nucleòtids. Aquest fenomen també ha estat observat in vivo emprant la injecció hidrodinàmica (214). L'explicació sembla radicar en el fet que aquestes molècules són reconegudes i processades per DICER gràcies als extrems 3' protuberants, facilitant així la interacció del RNA guia amb el RISC.

### **Vehiculització dels shRNA contra la PEPCK-C hepàtica**

El delivery de les molècules efectoras de RNAi és el "taló d'Aquiles" que en compromet la seva aplicabilitat in vivo. El desenvolupament de metodologies de delivery eficients i selectives per al teixit diana, sense toxicitat ni efectes off-target resulta imprescindible per a una aplicació terapèutica d'èxit.

En el present treball, com a eines experimentals de transferència gènica per a la transducció els vectors de shRNA de forma selectiva al fetge hem emprat en un cas, la tècnica de transferència gènica hidrodinàmica, i en l'altre, adenovirus recombinants. El tropisme natural dels adenovirus pel fetge i la idiosincràsia del mètode de transferència gènica hidrodinàmica ens van permetre obtenir sistemes experimentals per a la transducció específica al fetge de vectors d'expressió de shRNA contra PEPCK-C.

A l'acinus hepàtic, la PEPCK-C està present seguint un gradient decreixent a través del l'eix porto-central (219) (Figura 12). Independentment de la metodologia de delivery dels shRNA emprada en el present estudi (injecció hidrodinàmica de plasmidi nuu o vectors adenovirals), hem observat una atenuació de la immunotinció de PEPCK-C homogènia a tot el fetge, sempre mantenint el gradient porto-central d'expressió. Malgrat que la injecció hidrodinàmica ofereix una distribució del transgen a la zona pericentral-intermèdia, l'efecte de silenciament obtingut mitjançant la injecció hidrodinàmica de plasmidis d'expressió de shRNA és homogènia a tot el fetge. Al nostre laboratori hem vist que, emprant la injecció hidrodinàmica, l'expressió del plasmidi abasteix un perímetre més ampli quan la dosi és major. Altres estudis han descrit que, en resposta a injeccions hidrodinàmiques successives, es transfecten diferents poblacions d'hepatòcits, ampliant el radi d'abast (214). No es pot descartar, per tant, que el perímetre d'abast del plasmidi injectat hidrodinàmicament s'incrementi amb la dosi, podent arribar a la zona periportal a les altes dosis emprades en aquest l'estudi. Tampoc es pot descartar que els shRNA es difonguin pel parènquima hepàtic (des de la zona perivenosa a la periportal), tot i que la amplificació del RNAi de entre les cèl·lules contigües, com passa en *Caenorhabditis Elegans*, no ha estat descrit fins al moment en mamífers.

S'ha demostrat que l'eficiència de silenciament mitjançant shRNA depèn de l'abundància del mRNA diana (220). PEPCK-C s'expressa en altes quantitats en situacions de dejuni i diabetis. En concordança, una injecció hidrodinàmica amb una dosi baixa (30 µg) de pSHAG-664 no va proporcionar silenciament de PEPCK-C en el nostre model (dada no mostrada), fent necessari pujar la dosi fins a 100 µg de plasmidi d'expressió de shRNA per a aconseguir una silenciament significativa. També aquest fet explica que hi hagi una percentatge inferior en la silenciament en dejuni (quan la transcripció de *Pck1* és més activa i els nivells de mRNA són superiors al fetge) emprant la injecció hidrodinàmica i també amb l'ús de vectors adenovirals. Així, els alts nivells d'expressió del gen diana *Pck1*, fan necessari mètodes altament eficients per a la transducció dels shRNA al fetge, com els adenovirus, els quals permeten una transducció altament eficient dels hepatòcits.



## **Toxicitat associada als vectors de shRNA**

Els efectes no específics resultants de la introducció de RNAi poden aparèixer en resposta a diferents factors:

### 1. Activació de la resposta immune innata

S'ha demostrat que algunes seqüències de siRNA de 21 nt, així com vectors de shRNA poden activar aquestes vies ancestrals de protecció antiviral en cèl·lules de mamífers (159; 160; 162). Això ha fet d'obligat compliment la comprovació de que les seqüències emprades en els experiments de RNA d'interferència no promouen aquestes vies. En aquest estudi, aquesta comprovació es va fer avaluant marcadors d'ambdues vies. No es van trobar indicis d'activació de cap d'aquestes vies, podent descartar així l'activació de mecanismes inespecífics enfront a RNA de doble cadena, tant amb la utilització de mètodes físics que aporten una capacitat de transducció menor (transferència gènica hidrodinàmica) com amb mètodes virals que aporten una transducció superior (adenovirus).

### 2. Efectes off-target dependents de RISC.

Al principi, la selecció de la seqüència de siRNA es basava en dues premises: a) la identitat total amb el mRNA diana, ja que desaparellaments puntuals atenuen l'efecte silenciador (143; 144) i b) la selectivitat de seqüència per la diana. No obstant, la descripció posterior dels efectes inespecífics (off-target) dependents de seqüència va disparar les alarmes i incrementar el grau de complexitat en el disseny de molècules efectores de siRNA efectives per tal de minimitzar-ne els efectes secundaris.

Aquests efectes s'han associat amb aparellaments entre la regió seed i la regió 3'UTR de mRNAs no relacionats amb la diana (157; 158; 163; 165). Els estudis d'alineament contra el genoma de ratolí (MegaBLAST) de les cadenes sentit i antisentit del shRNA descarten una activitat silenciadora inespecífica deguda a aparellaments inespecífics o parcials amb regions codificants, o amb la regió 3'UTR d'altres mRNAs. No obstant, la constatació irrefutable de l'absència d'efectes off-target prové de la reproduïbilitat del fenotip obtingut amb una segona seqüència de siRNA independent contra el mRNA diana. Aquests experiments s'estan duent a terme actualment al nostre laboratori. No obstant, no hem d'oblidar que l'ús de siRNA, com d'altres teràpies farmacològiques, no està lliure d'efectes secundaris. De fet, donada la complexitat del genoma, qualsevol seqüència de siRNA estarà

associada a una “empremta” única de gens afectats per l'efecte off-target, depenent únicament de la seva seqüència i no del mètode de vehiculització (158).

Se sap que l'addició de residus 2'-O-metil ribosil a la posició 2 de la cadena guiat del siRNA minimitza aquets efectes off-target deguts a complementaritats de la regió seed, sense perdre la funcionalitat de la molècula (144; 165). No obstant, les modificacions químiques són aplicables sobre molècules sintètiques de siRNA, no sobre vectors d'expressió de shRNA. Un aproximació farmacològica per a la reducció de la PEPCK-C hepàtica podria ser la vehiculització d'un siRNA sintètic modificat amb 2'-O-metil per a minimitzar l'efecte off-target, estratègia que s'està desenvolupant activament al nostre laboratori.

### 3. Saturació de la maquinària cel·lular de processament de miRNA endògens.

L'expressió sostinguda d'alts nivells de shRNA pot induir hepatotoxicitat severa, morbiditat i, en casos extrems, mortalitat, com a conseqüència del bloqueig de la via de processament dels miRNA endògens per competència dels shRNA exògens (164). Aquest tipus de toxicitat ha estat observada després de la transducció del fetge amb dosis altes ( $10^{12}$  partícules) de virus adenoassociat del serotipus 8 (AAV8) (164). En contraposició, la transducció del fetge amb dosis altes de vectors adenovirals (fins a  $4 \times 10^9$  p.f.u) no ha resultat en el bloqueig de la via de processament dels miRNA (220). Tenint en compte que per a la transducció de més del 95% dels hepatòcits són suficients dosis de  $2 \times 10^{11}$  partícules de AAV8 (164) o  $2 \times 10^9$  p.f.u d'adenovirus (220), la toxicitat per saturació de la via de processament dels miRNA endògens sembla estar associada a la una sobrecàrrega cel·lular de shRNA, per sobre d'un llindar de toxicitat i, possiblement, per sobre del requeriment necessari per a obtenir un silenciament eficient del gen diana.

En els nostres models in vivo la potència de la silenciació correlaciona amb la càrrega viral, suggerint que les dosis d'adenovirus emprades no estan saturant la maquinària endògena de processament. Addicionalment, no hem observat cap dels símptomes que s'han associat a aquest tipus de toxicitat: la supervivència dels animals en cap cas es va veure compromesa, aquests mostraven en tot moment un comportament normal, sense signes de morbiditat més enllà de la patologia diabètica i els animals tractats guanyaven pes en paral·lel als control no infectats. La funcionalitat del fetge tampoc es va veure altrada, ja que no es van observar alteracions com necrosi, fibrosi o hepatomegàlia en la necròpsia. Finalment, els nivells de transaminases sèriques i l'activitat caspasa

3 hepàtica confirmen que l'expressió dels shRNA al fetge dels ratolins no provoca toxicitat significativa, més enllà del descrit per als mètodes de transfecció emprats (210). Es pot descartar, per tant, un fenotip inespecífic degut a la inducció de necrosi o apoptosi hepàtica induïda per toxicitat derivada dels shRNA.

### **Impacte metabòlic de la reducció de PEPCK-C hepàtica**

Durant dècades, la PEPCK-C s'ha considerat com a un enzim eminentment gluconeogènic. No obstant, estudis recents en els que s'han emprat diferents models de ratolí knock-out, tant a nivell sistèmic (93; 95) com de forma específica a fetge (94; 96; 97), o teixit adipós (87), així com ratolins transgènics que sobreexpresen PEPCK a teixit adipós (88; 89) o a múscul (98), combinat amb l'ús de tècniques de marcatge isotòpic, anàlisis bioquímic i ressonància magnètica nuclear, han permès l'estudi del rol metabòlic que PEPCK-C té en els diferents teixits. Aquests estudis, descrits en més detall a l'apartat introductori, han posat de manifest la funció integradora de PEPCK, no només en l'homeòstasi de la glucosa (GNG hepàtica), sinó també en el metabolisme lipídic (gliceroneogènesi hepàtica i en teixit adipós) i energètic (cataplerosi i anaplerosi). Dels resultats obtinguts en el present estudi se'n desprèn la mateixa conclusió en termes generals: PEPCK té una implicació no només en la gluconeogènesi hepàtica, sinó també en la integració del metabolisme energètic hepàtic. Malgrat aquestes coincidències hi ha aspectes concrets on encara existeix controvèrsia. Aquestst aspectes es discuteixen a continuació:

#### **Efecte dels nivells de PEPCK-C sobre la glucèmia**

La millora en l'homeòstasi de la glucosa observada a conseqüència de la reducció parcial de PEPCK-C al fetge dels ratolins diabètics, fa palesa la transcendència d'aquest enzim gluconeogènic en la hiperglucèmia durant el dejuni característica de la diabetis (52; 100). Aquests resultats contrasten amb la normoglucèmia, fins i tot en períodes llargs de dejuni, que mostra el model de ratolí knock-out per a PEPCK-C hepàtica (95). El manteniment de la glucèmia en aquest model podria ser degut a efectes compensatoris intra i extrahepàtics entre els que s'inclouen:

a) Una menor utilització de glucosa a nivell sistèmic, que podria aconseguir-se extremant el repòs. En aquest sentit, cal indicar que, els ratolins sense PEPCK-C hepàtica, després d'un dejuni, no son

capaços de mantenir la glucèmia més enllà de pocs minuts després de l'inici de l'exercici (95), suggerint, que son incapaços de generar glucosa suficient per a sustentar un requeriment important.

b) Una major gluconeogènesi extrahepàtica (96). La gluconeogènesi extrahepàtica podria donar-se al ronyó i/o a l'intestí prim (dos teixits amb capacitat gluconeogènica) a partir de glutamina, tot i que l'activitat gluconeogènica a aquests teixits no ha estat mesurada de forma directa pels autors. Aquesta glutamina provindria de la transaminació d'intermediaris del cicle de Krebs, que es troba, a més, bloquejat en aquestes ratolins (Figura 74).

c) Una altra font de glucosa podria ser la gluconogènesi hepàtica sustentada per la PEPCK mitocondrial (PEPCK-M). No obstant, la PEPCK-M en murins representa només el 5 % del contingut total de PEPCK i resulta improbable que hi tingui cap paper significatiu. A més, els autors no van detectar-ne un increment en l'activitat al fetge (95).

L'origen d'aquestes adaptacions no està clar. La deficiència crònica de PEPCK-C hepàtica pot desencadenar efectes compensatoris adaptatius que podrien explicar la manca de control de l'enzim sobre glucèmia en el model de genosupressió, en comparació amb la supressió aguda testada en el nostre laboratori. L'adaptació dels animals genosuprimits a la carència de PEPCK-C al fetge es podria explicar com a conseqüència de la supressió del gen en estadis molt primerencs de l'ontogènia, característica inherent al model de trangènesis. En la generació del model knock-out els ratolins quimèrics amb els al·lels floxed (amb el gen *Pck1* flanquejat per les dianes loxP de la Cre recombinasa) són creuats amb els ratolins quimèrics que expressen la recombinasa Cre sota el promotor de la albúmina, que proporciona expressió específica al fetge (95). Aquest promotor comença a expressar el dia 15 prenatal (253), mentre que l'activació transcripcional de PEPCK-C és perinatal (70). Per tant, un possible procés adaptatiu seria vital per a superar el període prenatal, en el que la inducció de la gluconeogènesi hepàtica és essencial per a la supervivència del fetus a mig termini i per al manteniment de la normoglucèmia en dejú a llarg termini. Hi ha altres exemples a la literatura de disparitat entre els resultats obtinguts en models de silenciament a curt termini mediada per RNA d'interferència i els models de ratolins knock-out (254; 255).

### **Control del flux de la via gluconeogènica**

Els resultats presentats en el present treball demostren que una reducció d'un 50% en el contingut proteic de PEPCK-C resulta en una menor capacitat de producció hepàtica de glucosa. Contràriament, altres autors han trobat que no hi ha una correlació lineal entre els nivells de PEPCK-

C en fetge i el flux gluconeogènic i que PEPCK-C té un coeficient de control de flux metabòlic de  $R=0,18$  sobre la gluconeogènesi (94), però sí entre els nivells de PEPCK-C i el flux del cicle de Krebs ( $R=0,88$ ). Aquest i altres estudis anteriors (256), suggerint un paper fonamental de l'enzim sobre el control de la cataplerosi del cicle de Krebs. Cal tenir en compte, per explicar aquestes discrepàncies, que aquests estudis estan fets en fetges aïllats perfundits en absència de senyalitzacions hormonals i nutricionals. En canvi, l'anàlisi fet en el nostre estudi és fisiològic i detecta un efecte coordinat i sobre la via gluconeogènica mediat per senyals metabòliques, però també hormonals (Figura 72), que es reflexa en una menor glucèmia i producció de glucosa a partir de piruvat in vivo, com a conseqüència de la silenciació de PEPCK-Cal fetge. Els mecanismes que condueixen als efectes observats serien directes i indirectes:

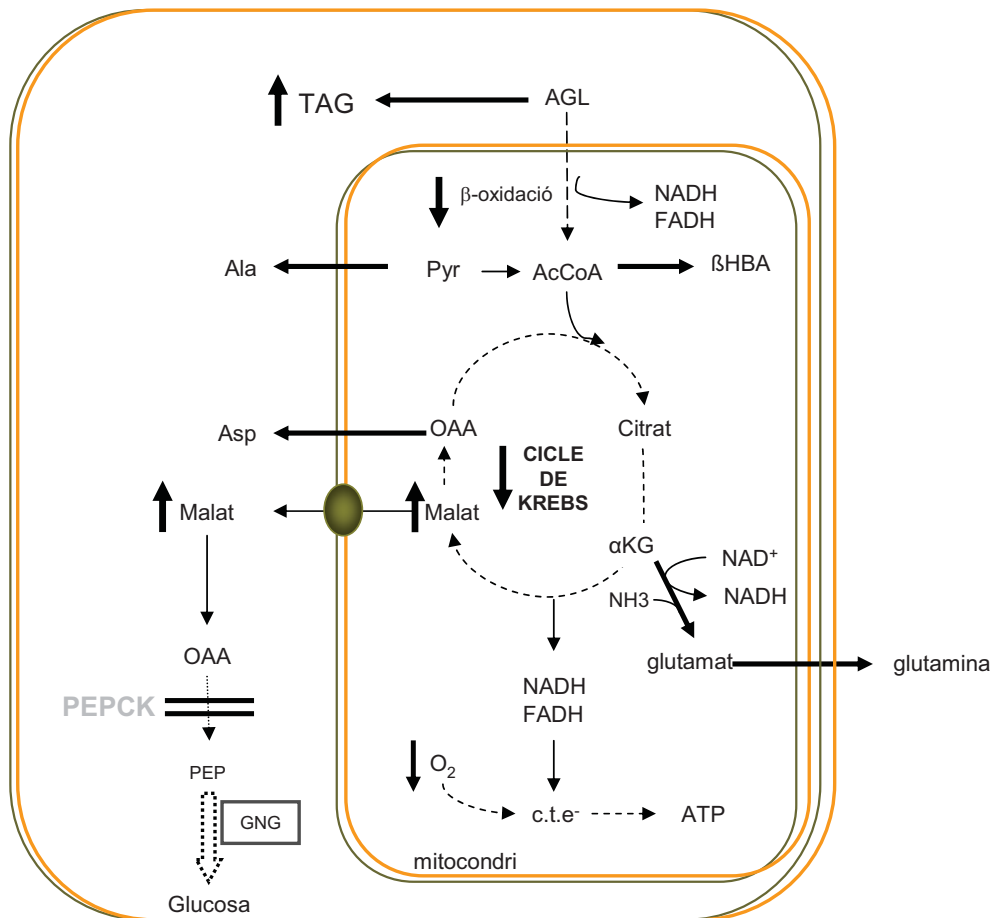
- D'una banda, una senyalització nutricional, directament derivada del menor flux gluconeogènic (increment en la relació  $NADH/NAD^+$  intracel·lular), orquestrada per Sirt-1, que coordinaria directament la regulació negativa de reguladors específics de la via (FOXO1 i PGC-1 $\alpha$  i HNF4- $\alpha$ ) generant un feed-back negatiu.
- De l'altra, la millora de la sensibilitat a la insulina al fetge, derivada indirectament de la reducció de la producció hepàtica de glucosa, contribueix a una menor taxa de transcripció de gens gluconeogènics.

Aquests dos mecanismes s'han discutit en profunditat a l'apartat Discussió del Capítol 2.

### **PEPCK en la cataplerosi i el metabolisme energètic**

Estudis del laboratori del Dr. Hanson (93) i el Dr. Magnuson (96; 97) demostren que PEPCK-C és essencial en la cataplerosi (eliminació d'àcids tricarboxílics del cicle de Krebs) i que la fallada del procés al fetge dels ratolins sans resulta en un bloqueig del cicle de Krebs, els intermediaris del qual s'acumulen, que deriva en bloqueig de la funció mitocondrial al fetge (Figura 74). En contraposició el conjunt de dades presentades en aquest treball ens indiquen que la reducció en un 50% de PEPCK-C en el fetge dels ratolins diabètics, no comporta un bloqueig en la funció mitocondrial. No hem trobat indicis d'una aturada del cicle de Krebs, ja que no hem trobat acumulació dels intermediaris del cicle, ni indicis d'un bloqueig de la respiració mitocondrial. La mateixa conclusió es desprèn dels estudis d'inhibició farmacològica de PEPCK-C amb l'àcid 3-mercaptocolínic (3-MPA) en fetges perfundits

de rata i cobaia realitzats a la dècada dels 70 (200; 201) on els fetges en presència de 3-MPA, redueixen dràsticament la producció de glucosa, però mantenen el consum d'oxigen.



**Figura 74. Paper de PEPCK en la cataplerosi i el metabolisme energètic en fetge: efectes de la supressió de la seva expressió**

El bloqueig del cicle de Krebs al fetge del model de ratolí knock-out, resulta en l'aturada del consum d'oxigen i, presumiblement, en l'aturada de la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos, que s'acumulen en forma de TAG, fent el fetge gras (93; 95; 97) (Figura 74). Els resultats obtinguts en el nostre model de supressió parcial de PEPCK-C en ratolins diabètics (STZ+ i db/db) no mostraven indicis d'una aturada del cicle de Krebs ni de la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos. En canvi, també hi ha acumulació de greixos, principalment àcids grassos, la importació i activació dels quals estaria facilitada per

l'increment en la càrrega energètica cel·lular. Aquests àcids grassos finalment s'acumularien al fetge, sobrepasant-ne la capacitat de metabolitzar-los (Figura 75)

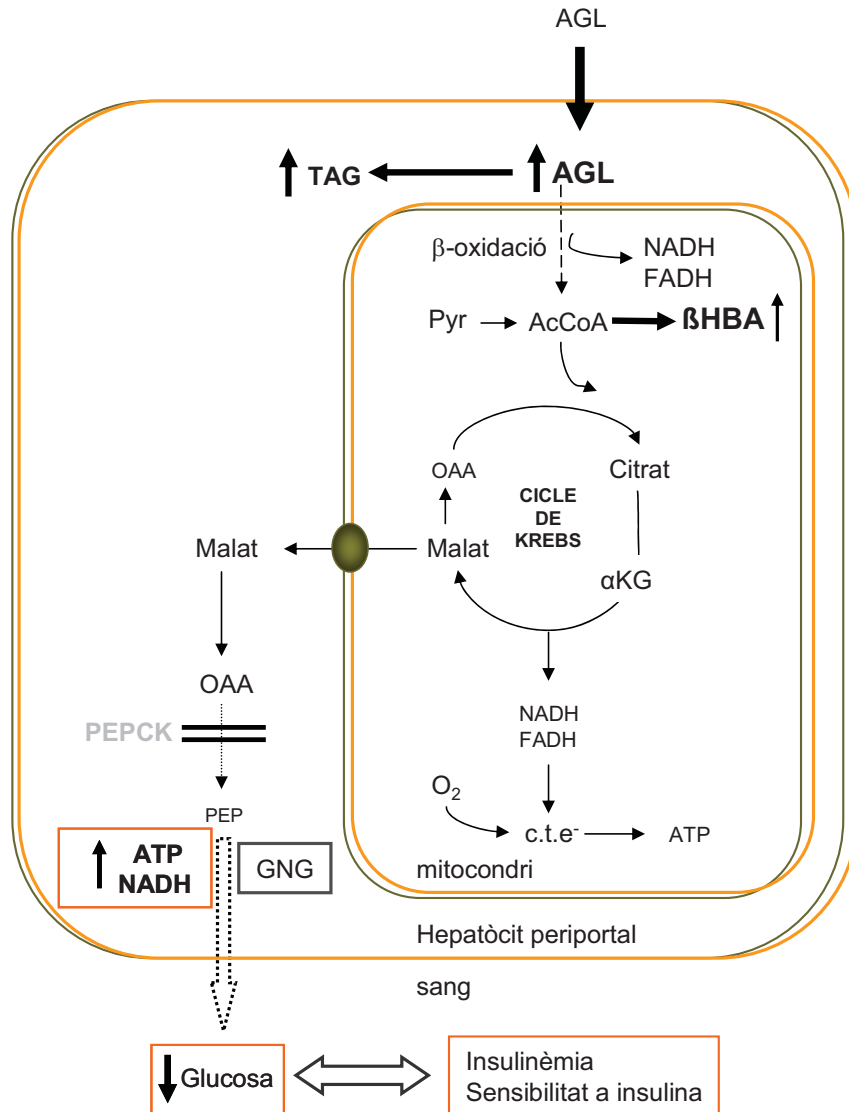


Figura 75. Efectes sobre l'homeòstasi de la glucosa i el metabolisme energètic de la supressió parcial de PEPCK en el fetge de ratolins diabètics db/db.

Els ratolins knock-out presenten una ablació total del gen Pck1, mentre el present estudi aconsegueix una reducció parcial aproximadament del 50% gràcies a la tecnologia del RNA d'interferència. Per tant, els resultats d'un i altre estudi no resulten contradictoris, sinó complementaris. Assumint la

importància demostrada de la funció catapleròtica de PEPCK-C per al manteniment del cicle de Krebs, vam analitzar en el nostre model l'efecte de la reducció en un 90% del contingut proteic de PEPCK-C i vam poder constatar una disminució en la capacitat de la respiració mitocondrial, en concordància amb els estudis en ratolins knock-out (94; 95; 97), suggerint que hi ha un llindar, a partir del qual l'absència de PEPCK-C no suporta la cataplerosi relativa al cicle de Krebs i es veu afectat el metabolisme mitocondrial.

D'altra banda, no hem d'oblidar que un i altre estudi estan basats en models diferents i tenen objectius diferents. Els estudis de knock-out específic de fetge es van dur a terme en ratolins sans amb la finalitat de discernir el paper fisiològic de PEPCK-C en la integració del metabolisme energètic, mentre que els nostres estudis han estat focalitzats en la dissecció de les implicacions de PEPCK-C en diabetis, on la seva expressió aberrant s'associa a la progressió de la malaltia. Fins al moment, els ratolins knock-out de PEPCK-C en fetge no han estat estudiats en un background genètic de diabetis com el que es presenta en aquest estudi.

Salvant les discrepàncies, entre els nostres resultats i els estudis de knock-out sí que trobem concòrdia en el fet que PEPCK-C no només té un paper en la modulació del flux de la via gluconeogènica, sinó que té un paper clau en la integració del metabolisme energètic, tal i com s'ha descrit i discutit al Capítol 2.

Les dades aportades en aquest estudi s'uneixen al gruix d'estudis que indiquen que PEPCK-C té un paper clau en la diabetis (52; 100-102; 199) i a més aporten una nova aproximació terapèutica per al tractament de la diabetis. En resum, en aquest treball es presenten evidències per a mantenir que la silenciació parcial de PEPCK en diabetis condueix a una millora en el control de la glucèmia, insulinèmia i la sensibilitat perifèrica a la insulina a través d'un mecanisme coordinat en el que estan implicats efectes directes i indirectes respecte la reducció de la producció hepàtica de glucosa. Una reducció coordinada de la via gluconeogènica, probablement mediada tant per factors nutricionals com hormonals derivats de la reducció de la producció hepàtica de glucosa, implica a reguladors clau responsables de la activació de la via gluconeogènica (Sirt-1, HNF4- $\alpha$ , PCG-1 $\alpha$ ) sense afectació del cicle de Krebs ni de la funció mitocondrial. Addicionalment, aquest model contribueix a trencar el dogma, recentment posat en tela de judici, de que la esteatosi hepàtica necessàriament condueix a resistència a insulina.



---

**CONCLUSIONS**

---



Dels resultats presentats en aquest estudi se'n poden extreure les següents conclusions:

1. S'ha clonat un caset d'expressió de shRNA contra la PEPCK-C, tant de rata com de ratolí, sota el control del promotor d'RNA polimerasa III U6 humà. S'ha validat la seva funcionalitat tant in vitro com in vivo, i s'ha comprovat que no indueix toxicitat associada a la resposta immune innata, ni a efectes off-target que resultin en morbiditat, mortalitat o patrons d'expressió incoherents amb la diana silenciada.
2. La injecció hidrodinàmica de plasmidis proporciona la seva transducció de forma majoritària al fetge, delimitant l'expressió del transgen als hepatòcits de la zona perivenosa-intermèdia de l'acinus hepàtic.
3. La injecció hidrodinàmica de plasmidis d'expressió de shRNA específics contra la PEPCK-C resulta en la seva silenciació parcial al fetge. Aquest efecte és coherent amb una transducció parcial del fetge i amb el patró de distribució de l'enzim, en un gradient porto-central a l'acinus hepàtic.
4. L'ús de vectors adenovirals constitueix una eina més potent que la injecció hidrodinàmica per a la vehiculització de shRNA al fetge, podent aconseguir una silenciació total d'una diana abundant i de distribució heterogènia a l'acinus hepàtic, com és la PEPCK-C.
5. Tant la injecció hidrodinàmica de vectors plasmídics, com els vectors adenovirals del serotip 5 proporcionen una eina adequada per a la transducció preferencial del fetge permetent validar la intervenció sobre una diana hepàtica.
6. La reducció parcial del contingut hepàtic PEPCK-C, en absència d'insulina, redueix la hiperglucèmia en dejuni, refermant el control directe que l'activitat enzimàtica PEPCK-C exerceix sobre la via gluconeogènica, la producció hepàtica de glucosa i la glucèmia, independentment dels efectes de la insulina sobre els dipòsits de glicogen.
7. En presència d'insulina, en el model murí de diabetis db/db, la reducció del contingut hepàtic de PEPCK-C millora l'homeòstasi de la glucosa com a conseqüència de la menor taxa de producció de glucosa a partir de substrats gluconeogènics.

8. En presència d'insulina, en el model murí de diabetis db/db, la reducció del contingut hepàtic de PEPCK-C millora la sensibilitat a la insulina, tant al fetge com als teixits perifèrics (múscul i teixit adipós).
9. L'activitat PEPCK-C està estretament lligada a l'homeòstasi lipídica: al fetge, la reducció de PEPCK-C hepàtica condueix a l'accumulació de lípids per causes multifactorials, que podrien incloure una reducció de la gliceroneogènesi hepàtica, un increment de la captació d'àcids grassos circulants i una menor reesterificació i exportació de triglicèrids en forma de VLDL. A nivell sistèmic, es produeix una millora en la dislipidèmia, que cursa amb una reducció de TAG i AGL sèrics.
10. L'accumulació hepàtica de lípids conseqüència de la disminució de PEPCK-C en els ratolins db/db no està associada a lipotoxicitat mediada per PKC $\epsilon$  sobre la via de senyalització de la insulina; dissociant, en aquest model, l'accumulació de lípids hepàtics i resistència a insulina.
11. La reducció del contingut de PEPCK-C hepàtica en els ratolins db/db conflueix en una regulació negativa coordinada de la gluconeogènesi mediada tant per senyals metabòliques derivades de la reducció de la via gluconeogènica (NADH), com per senyals hormonals (insulina).
12. L'accumulació de NADH intracel·lular secundària a la reducció de la via gluconeogènica podria ser la causa de la reducció del contingut hepàtic de Sirt1. D'aquesta manera, Sirt1 actua com a mediador d'una senyal metabòlica i modula negativament la via gluconeogènica, reduint l'activitat transcripcional de factors com FOXO1, PGC-1 $\alpha$  i HNF4 $\alpha$  implicats en la transcripció dels enzims gluconeogènics (PEPCK-C i G6Pasa). Per tant, la reducció de l'activitat Sirt1 de forma exclusiva al fetge podria ser una fita per al control de la gluconeogènesi hepàtica.
13. Donada la funció catapleròtica de PEPCK-C, l'ablació total de l'enzim al fetge resulta en un bloqueig del cicle de Krebs i una disfunció mitocondrial. No obstant, la silenciació parcial del seu contingut hepàtic no cursa amb una menor respiració mitocondrial, suggerint que el cicle de Krebs no està afectat i que la funció mitocondrial no se'n veu perjudicada.

14. La PEPCK-C, al fetge, no només té una funció gluconeogènica, sinó que conforma un important punt d'intersecció en el metabolisme energètic hepàtic, integrant el metabolisme de la glucosa, el dels lípids i la funció mitocondrial a través de la seva funció catapleròtica.
  
15. La modulació de la activitat PEPCK-C hepàtica constitueix una estratègia plausible per al control del síndrome metabòlic i la patologia diabètica.

En resum, les dades aportades en aquest estudi indiquen que la sobreexpressió de PEPCK-C, característica de la patologia diabètica, juga un paper clau en la regulació de l'homeòstasi energètica en models murins. També argumenten a favor de que la disminució de la seva activitat, de forma específica al fetge, constitueix una estratègia plausible per millorar l'homeòstasi de la glucosa i la sensibilitat a la insulina en la teràpia de la malaltia.



---

**MATERIAL I MÈTODES**

---





---

## ÍNDIX DE CONTINGUTS

---

### TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

Obtenció i manipulació dels vectors plasmídics.....	- 173 -
Manipulació enzimàtica del DNA .....	- 174 -
Electroforesi en gels d'agarosa.....	- 174 -
Aïllament i purificació de fragments de DNA.....	- 174 -
Subclonatge .....	- 175 -
Cultius bacterians .....	- 175 -
Cultiu líquid .....	- 175 -
Cultiu sòlid .....	- 175 -
Obtenció de cèl·lules d' Escherichia coli competents per a la transformació de DNA plasmídic.....	- 176 -
Transformació en cèl·lules Escherichia coli .....	- 177 -
Selecció de clons .....	- 177 -
Preparació d'estocs de glicerol .....	- 177 -
Purificació de DNA plasmídic.....	- 178 -
Generació dels vectors d'expressió de shRNA.....	- 178 -
Generació d'adenovirus recombinants.....	- 180 -
Preparació i anàlisi de RNA .....	- 183 -
Anàlisi dels nivells de mRNA per Northern Blot.....	- 184 -
Anàlisi dels nivells de mRNA per PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR).....	- 186 -

### TÈCNiques DE CULTIU CEL·LULAR I EXPERIMENTS IN VITRO

Línies cel·lulars .....	- 188 -
Transfeccions.....	- 188 -
Obtenció d'hepatòcits de ratolí.....	- 189 -
Respirometria d'alta resolució.....	- 191 -

### ANÀLISI DE LES PROTEÏNES

Preparació d'homogenats .....	- 194 -
Obtenció d'homogenats totals a partir de cèl·lules en cultiu.....	- 194 -
Obtenció d'homogenats totals a partir de teixit.....	- 194 -
Obtenció de la fracció nuclear a partir de teixit congelat .....	- 195 -
Separació de la fracció citosòlica i membranosa de fetge .....	- 195 -
Valoració de la concentració de proteïna als homogenats .....	- 196 -
Mètode BCA.....	- 196 -
Mètode Bradford .....	- 196 -
Anàlisi de proteïnes per Western Blot.....	- 196 -

### TÈCNiques HISTOLÒGIQUES

Preparació de mostres histològiques.....	- 200 -
Obtenció de seccions de 50 µm .....	- 200 -

Obtenció de crioseccions de 7 µm .....	- 200 -
Immunohistoquímica de PEPCK-C .....	- 201 -
Tinció de lípids .....	- 202 -

## DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES

Activitat PEPCK .....	- 203 -
Activitat caspasa 3 .....	- 204 -
Determinació de paràmetres sèrics .....	- 205 -
Determinació de glucosa .....	- 205 -
Determinació d'insulina .....	- 205 -
Determinació de Glutamat Piruvat Ttransaminasa (GPT) E.C. 2.6.1.2. sèrica .....	- 205 -
Determinació d'àcids grassos no esterificats (AGL), Triglicèrids (TAG), β-Hidroxitbutirat (β-HBA), colesterol i lactat. ....	- 205 -
Determinació del colesterol HDL .....	- 205 -
Determinació de metabòlits hepàtics .....	- 206 -
Glicogen .....	- 206 -
TAG i àcids grassos hepàtics .....	- 206 -
Nucleòtids intracel·lulars (ATP, ADP, AMP) .....	- 207 -
Acil-CoA de cadena curta .....	- 208 -

## MODELS ANIMALS I EXPERIMENTS IN VIVO

Models animals .....	- 209 -
Model de diabetis tipus I: inducció de diabetis experimental mitjançant estreptozotocina .....	- 209 -
Model de diabetis tipus II: ratolí db/db .....	- 210 -
Transferència gènica hidrodinàmica .....	- 210 -
Administració dels adenovirus .....	- 210 -
Administració de galactosamina-LPS .....	- 211 -
Administració d'àcid 3-mercaptocolínic .....	- 211 -
Mesura de la glucèmia .....	- 212 -
Administració de metformina .....	- 212 -
Administració de poli dl:dC .....	- 212 -
Dejuni .....	- 212 -
Test de tolerància intraperitoneal a la glucosa .....	- 213 -
Test de sensibilitat perifèrica a la insulina .....	- 214 -
Test de producció de glucosa a partir de piruvat .....	- 214 -
Gàbies metabòliques .....	- 215 -
Anestèsia, eutanàsia i presa de mostres .....	- 215 -
Obtenció de sèrum .....	- 215 -
Obtenció de teixits .....	- 216 -

---

**TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR**


---

**Obtenció i manipulació dels vectors plasmídics**

Aplicació	Nomenclatura	Construcció	Antibiòtic
Expressió PEPCK-C	<b>pC/PEPCK</b>	cDNA de PEPCK subclonat al lloc BamHI de pCAGGS, vector bicistrònic que proporciona elevats nivells d'expressió (257).	Amp
Reporter	<b>pEGFP</b>	Promotor CMV unit a una proteïna verda fluorescent Enhanced (EGFP) (Clontech).	Amp
	<b>pGL3</b>	Promotor SV40 unit al gen de la luciferasa de <i>Photinus pyralis</i> (Promega)	Amp
	<b>pCESlucSV</b>	Proveït pel Dr. Mark Cooper (Copernicus Therapeutics Inc.). Promotor del factor d'elongació 1 i l'enhancer de CMV unit al gen de la luciferasa de <i>Photinus pyralis</i> .	Amp
Expressió de shRNA	<b>pSHAG-1</b>	Proveït pel Dr. Greg Hannon (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA) Promotor humà U6 de RNA polIII (-265_+1) seguit de un lloc BseRI- BamHI per al clonatge de seqüències d'expressió de shRNA.	Kan
	<b>pSHAG-Ff</b>	Proveït pel Dr. Greg Hannon (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA) pSHAG que expressa shRNA contra la luciferasa de <i>Photinus pyralis</i> .	Kan
	<b>pSHAG-482</b>	pSHAG que expressa shRNA contra PEPCK	Kan
	<b>pSHAG-664</b>	pSHAG que expressa shRNA contra PEPCK	Kan
Construcció d'adenovirus	<b>pTG6600<math>\Delta</math>CMV</b>	Vector llançadera per a la construcció d'Adenovirus, sense promotor. Ad5(1-458)-MCS-Ad5(3328-5788).	Amp
	<b>pTG6600-U6-Ff</b>	Vector llançadera per a la construcció d'Adenovirus, amb la seqüència Ff sota el control del promotor humà U6 de RNA polIII	Amp
	<b>pTG660-U6-664</b>	Vector llançadera per a la construcció d'Adenovirus amb la seqüència 664sota el control del promotor humà U6 de RNA polIII.	Amp
	<b>pKp1.4<math>\Delta</math>CMV</b>	Genoma adenoviral d'Ad5 ( $\Delta$ E1-E3).	Amp
	<b>pKp1.4-U6-Ff</b>	Genoma adenoviral d'Ad5 ( $\Delta$ E1-E3) amb el caset d'expressió del shRNA contra la luciferasa (Ff) controlat pel promotor humà U6 de RNA polIII.	Amp
	<b>pKp1.4-U6-664</b>	Genoma adenoviral d'Ad5 ( $\Delta$ E1-E3) amb el caset d'expressió del shRNA contra la PEPCK-C (664) controlat pel promotor humà U6 de RNA polIII..	Amp

Taula 16. Plasmidis utilitzats. Amp; ampil·lina, Kan; kanamicina

## Manipulació enzimàtica del DNA

Les endonucleases de restricció són enzims purificats de bacteris o de fongs, que presenten una marcada especificitat vers seqüències curtes de DNA i actuen sobre elles trencant els enllaços fosfodièsters i, per tant, la cadena de DNA.

De forma general, es digereix el DNA amb una proporció de 5 U/ $\mu$ g de DNA durant un període d'1 a 3 hores a 37°C, excepte que el proveïdor indiqui una altra temperatura òptima per a l'enzim en qüestió. S'ha de tenir present no superar el 5% de glicerol al tampó de restricció, per a no comprometre l'activitat enzimàtica.

## Electroforesi en gels d'agarosa

Per a la separació analítica o preparativa de fragments de DNA de mida superior a 100 pb les mostres de DNA s'han sotmès a electroforesi en gels d'agarosa, en tampó TAE 1X. El percentatge d'agarosa que aplicarem en el gel dependrà de la mida dels fragments de DNA que esperem. Habitualment es preparen els gels d'agarosa a l'1%.

La mostra de DNA es prepara amb tampó de càrrega 1X i es carrega als pouets del gel. El DNA es sotmet a electroforesi a 100V durant 30-60 minuts, fins que el front (blau de bromofenol) arriba al final del gel. La visualització del DNA s'aconsegueix mitjançant la incorporació al gel del colorant fluorescent bromur d'etidi (0,5  $\mu$ g/ml), que s'intercala entre les cadenes de DNA i apareix com una banda de color taronja quan és sotmès a il·luminació ultraviolada. Aquesta tècnica permet detectar quantitats de fins a 10 ng de DNA.

Tampó de càrrega 10X	TAE 50X
Glicerol 50% (vol/vol)	Tris 40 mM
EDTA 100 mM	Àcid acètic 20mM
SDS 1% (vol/vol)	EDTA 1 mM
Blau de bromofenol 0.1% (p/vol)	
Xilen Cianol FF 0.1%(p/vol)	

## Aïllament i purificació de fragments de DNA.

Per a la purificació de fragments de DNA en gels d'agarosa s'ha utilitzat el kit Quiaquick Gel Extraction (Quiagen) basat en la dissolució del fragment d'agarosa que conté la banda desitjada en un agent caotrópic. Aquestes condicions permeten una adsorció selectiva del DNA a una matriu de

silice. El DNA posteriorment es renta i s'elueix en condicions de baixa força iònica, normalment H<sub>2</sub>O. Es va seguir el protocol dels subministradors.

### **Subclonatge**

Un cop tenim els fragments de DNA purificats, amb l'objecte de construir molècules híbrides de DNA, els fragments són barrejats a diferents proporcions molars insert:vector (1:1, 1:3 i 3:1) i tractats amb una unitat DNA lligasa del bacteriòfag T4, que catalitza la formació d'enllaços fosfodièster entre els extrems 3'OH i 5'P adjacents, en un volum final de 10 µl. La reacció s'incuba durant 1 hora a temperatura ambient, seguit d'una incubació a 4°C durant la nit. Al dia següent, es procedeix a la transformació en la soca convenient de bacteris competents.

### **Cultius bacterians**

Els bacteris que s'utilitzen per els protocols que s'han portat a terme corresponen a les soques d'*Escherichia coli* DH5α i XL1-blue per als clonatges rutinaris de plasmidis, i JM5183, TOP10 per al clonatge de les construccions dels vectors adenovirals. El material de vidre i els medis de cultius (LB o LB-agar) s'esterilitzen per autoclau, i la manipulació dels bacteris es realitza en condicions d'esterilitat (sota flama o en campana de flux laminar).

#### **Cultiu líquid**

En el cas dels cultius líquids, es fan créixer les cèl·lules en agitació (220 rpm) amb medi LB a 37°C durant tota la nit (12-16 hores). El recipient on es realitza el cultiu no s'omplirà mai més d'una tercera part, per a garantir una bona oxigenació del cultiu, que permei el creixement exponencial del mateix. En el cas que les cèl·lules transformades amb un plasmidi, per a exercir una pressió selectiva i afavorir el creixement de les cèl·lules que hagin incorporat el plasmidi, s'addiciona un o altre antibiòtic segons la resistència codificada pel plasmidi.

#### **Cultiu sòlid**

Els cultius sòlids es fan sobre plaques de LB-agar que també inclouran l'antibiòtic d'elecció, en el cas pertinent. Les plaques es deixen cap per avall a 37°C tota la nit (12-16 hores). És important deixar-los en aquesta posició per tal d'evitar que el vapor d'aigua impregni el medi de cultiu.

LB líquid	LB-agar
NaCl 5 g/l	NaCl 5g/l
Triptona-peptona 10 g/l	Triptona-peptona 10 g/l
Extracte de llevat 10 g/l	Extracte de llevat 10 g/l
	Agar 15 g/l

Antibiòtic	Estoc (1000X)	Concentració en cultiu
Ampicil·lina	50 mg/ml	50 µg/ml
Kanamicina	30 mg/ml	30 µg/ml

### **Obtenció de cèl·lules d' Escherichia coli competents per a la transformació de DNA plasmídic**

Per a obtenir grans quantitats del DNA plasmídic clonat, aquest s'introdueix a una soca bacteriana, seguint el protocol de transformació bacteriana, on es mantindrà de forma episomal i s'amplificarà en les successives replicacions bacterianes. Per a capacitar les bacteries per a internalitzar el plasmidi, cal sotmetre-les al següent un tractament que indueixi porus a la membrana externa:

1. Inocular sobre 2 ml de LB sense antibiòtic cèl·lules d'Escherichia coli provinents d'un estoc de glicerol mare i créixer durant tota la nit a 37°C en agitació (220 rpm).
2. El matí següent, transvassar el mini-cultiu a un Erlenmeyer que conté 100 ml de LB sense antibiòtic. Deixar aproximadament 2 hores a 37°C en agitació. Cada 30 minuts extreure una alíquota del cultiu i mesurar-ne l'absorbància a 595 nm. Aturar el cultiu quan l'absorbància estigui entre 0.35-0.60. En aquest moment el cultiu està en creixement exponencial.
3. Es refreda el creixement durant uns 15 minuts a 4°C. Un cop refredat es passa el cultiu a tubs de 50 ml (també pre-refredats). A partir d'aquest punt, tot el tractament es realitza a 4°C, les solucions pre-refredades en gel i el material pre-refreat a la nevera. Això millora la supervivència de les cèl·lules al tractament de xoc amb la solució de competents.
4. Es centrifugua el cultiu bacterià durant 10 minuts a 4°C a 2500 rpm i es descarta el sobrenedant.
5. El precipitat obtingut es resuspèn en 15 ml de la solució per competents freda i es repeteix la centrifugació en les mateixes condicions.
6. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn en 4 ml de la solució de competents.
7. S'aliquota el més ràpid possible en fraccions de 200 µl i es congela en N<sub>2</sub> líquid. Es conserven a -80°C.

Solució de competents
PIPES 10 mM
CaCl <sub>2</sub> 60 mM
Glicerol 15%
pH 7.4

### **Transformació en cèl·lules Escherichia coli**

Els productes de la barreja de lligació, o els plasmidis que es volen amplificar són introduïts en cèl·lules competents *Escherichia coli* segons el següent protocol:

1. Es descongela en gel una alíquota de cèl·lules competents en gel.
2. S'afegeixen uns 50 ng del plasmidi que es vol transformar (en cas que provingui d'una lligació s'afegirà 5 µl) en 100 µl de competents.
3. Es realitza un xoc tèrmic fred-calor: 20 minuts en gel- 45 segons a un bany a 42°C- 2 minuts en gel.
4. S'afegeixen 900 µl de LB sense antibiòtic. Es deixa en agitació 45 minuts a 37°C per a permetre a les cèl·lules que es recuperin del xoc tèrmic.
5. Centrifugar durant 1 minut i decantar el sobrenedant.
6. Resuspendre el contingut de cèl·lules amb el volum residual de LB i plaquejar a plaques de LB-agar amb l'antibiòtic de selecció adient segons el plasmidi. Cultivar durant la nit a 37°C. Aquelles cèl·lules que han adquirit el DNA plasmídic creixeran preferentment, generant clons que creixen en colònies, mentre que les que no l'hagin incorporat moriran.

### **Selecció de clons**

Per tal de verificar quins clons contenen la construcció plasmídica correcta, s'inocula un mini-cultiu de 2ml a partir amb cada una de les colònies que es vulguin analitzar dels clons crescuts a la placa de LB-agar i es creix a 37°C en agitació (220 rpm) durant la nit. S'extreu el DNA plasmídic i s'analitza per digestió i posterior electroforesi en un gel d'agarosa el patró de bandes. És convenient guardar estocs de glicerol dels clons positius dels plasmidis, per a poder amplificar el clo a partir d'ells.

### **Preparació d'estocs de glicerol**

Un cop es té la construcció plasmídica final, es guarda un estoc bacterià a partir d'un cultiu exponencial dels bacteris en medi LB (durant la nit a 37°C en agitació): 810 µl de cultiu i 190 µl de glicerol 80% (percentatge final de glicerol: 15%). Barrejar bé i conservar a -80°C.

## **Purificació de DNA plasmídic**

Per a la purificació de DNA a petita escala es parteix de 2 ml de cultiu bacterià líquid i es segueix el protocol del kit de mini-prep seguint les indicacions del proveïdor (Promega). Un cop purificat el plasmidi, es realitza una digestió amb enzims de restricció per a confirmar que es tracta del plasmidi correcte.

Per a la valoració de la concentració del DNA plasmídic es mesuren les absorbàncies a  $\lambda$  260nm i 280 nm de una dilució 1/50 i es calcula la concentració segons la fórmula:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 50 / \mu\text{l DNA plasmídic}$$

La puresa s'estima segons la relació  $A_{260} / A_{280}$ . Una solució pura de DNA té una  $A_{260} / A_{280}$  entre 1.8 i 2. Relacions inferiors són indicatives de contaminació per proteïnes o substàncies aromàtiques (fenol, etc). Relacions superiors poden ser degudes a contaminació per RNA.

Per tal d'obtenir quantitats elevades de DNA per al seu us en experiments de transfecció en cultiu cel·lular in vitro o per a la injecció d'animals in vivo es parteix d'un cultiu de 150-500 ml i s'utilitza el kit de maxi-prep (proporciona un rendiment de fins a 500  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídic) o mega-prep (proporciona un rendiment de fins a 2 mg de DNA plasmídic), segons les indicacions del kit. En aquests casos s'obtenen preparacions de DNA plasmídic lliures d'endotoxines. La presència d'endotoxines en les preparacions plasmídiques són causa de la inhibició de la seva expressió i provoquen reaccions inflamatòries in vivo, anul·lant-ne l'expressió. En les preparacions de DNA plasmídic a gran escala per a posteriors experiments tant in vitro com in vivo s'han utilitzat els kits comercials GenElute Endotoxin-free Maxiprep plasmid Purification kit (Sigma) o Megaprep: Nucleobond Endotoxin-free Plasmid DNA Purification kit (Macherey-Nagel). Aquests kits permeten l'obtenció de DNA plasmídic lliure d'endotoxines partint de 125 o 500 ml de cultiu bacterià líquid en LB, respectivament.

## **Generació dels vectors d'expressió de shRNA**

Es van dissenyar dos parelles d'oligonucleòtids codificants per shRNA dirigits contra PEPCK-C de *Ratus norvegicus* com de *Mus musculus*, el primer començant pel nucleòtid 482 a partir de l'inici de traducció, i el segon començant pel nucleòtid 664. La seqüència nucleotídica es detalla a continuació:



**482:**

**OLIGONUCLEÒTID A:**

5'CATGCTGGCCACCCACATAGGGCGAGTCTGAAGCTTGAGACTCGTCCTATGTGGTGGCCGGCG  
TGTGGTTTTTT3'

**OLIGONUCLEÒTID B:**

5'GATCAAAAACCCACACGCCGGCCACCCACATAGGACGAGTCTCAAGCTTACCTGGCGCACTG  
GCTGAGCATGGCCCACG-3'

**664:**

**OLIGONUCLEÒTID A:**

5'AGGAGATGATCTCTCTGCGGTCCGGGAGAAGCTTGTTCCGGATCGCAGGGAGATTATCTCCTT  
CGTTTTTTT-3'

**OLIGONUCLEÒTID B:**

5'GATCAAAAACCGAAGGAGATAATCTCCCTGCGATCCGGAACAAGCTTCTCCTGGACCGCAGA  
GAGATCATCTCCTTCG-3'

Per a obtenir els plasmidis d'expressió dels shRNA es van seguir els següents passos:

1. Anellament dels oligonucleòtids.

Els oligonucleòtids, resuspesos a una concentració de 3 mg/ml van ser barrejats a concentracions equimolars, sotmesos a 95°C durant 4 minuts per a desnaturalitzar-los, seguit de 70°C durant 10 minuts i deixats atemperar lentament (uns 10 minuts), per a permetre l'anellament per complementarietat de seqüència. Un cop anellats es conserven en gel fins a successives manipulacions o a -20°C a llarg termini.

2. Fosforilació dels extrems 5'.

Els extrems 5' fosforilats permeten la lligació dels oligonucleòtids amb el vector desitjat. Es tracta 0,5 µg d'oligonucleòtid anellat amb 10 unitats de T4 polinucleòtid quinasa (Fermentas) durant 30 minuts a 37°C en presència de 0,1 mM ATP i en un volum final de 10 µl. La reacció es finalitza inactivant l'enzim per calor incubant a 70°C durant 10 minuts.

3. Es purifiquen els oligonucleòtids en columnes Sephadex G50 (GE Healthcare).

4. Lligació.

Un cop anellats, els fragments es van lligar al lloc BamHI-BseRI de pSHAG-1 i es va seguir el procés de clonatge tal i com es detalla a les pàgines anteriors. Els plasmidis obtinguts es van anomenar pSHAG-482 i pSHAG-664, respectivament (Figura 15 i taula 16).

## **Generació d'adenovirus recombinants**

Els adenovirus utilitzats en aquesta tesi han estat generats al servei de producció de virus del Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG) segons els PNT del servei. Es tracta d'adenovirus del serotipus 5 no replicatiu al qual se li ha deletionat la regió E1-E3. Per tant, per a la seva replicació i amplifcació requereixen cèl·lules productores que complementin en trans aquestes regions.

A continuació es fa una descripció breu del procés:

### 1. Construccions

Es va subclonar el caset d'expressió de shRNA U6-Ff i U6-664 (resultant de la digestió de pSHAG-Ff i pSHAG-664, respectivament, amb NotI-AscI) al vector llançadora p6600 $\Delta$ CMV en el lloc NotI-MluI seguint les tècniques de biologia molecular descrites. Es fa servir la soca bacteriana competent d'E.Coli TOP10.

### 2. Recombinació

Es linealitzava pKp1.4 $\Delta$ CMV amb PacI, mitjançant la incubació durant tota la nit (14-16 hores) a 25°C amb 10 U d'enzim/ $\mu$ g de DNA. A continuació, es procedeix a la recombinació amb el vector llançadora.

Es co-transformen p6600 $\Delta$ CMV i pKp1.4 $\Delta$ CMV linealitzat en la soca d'E. Coli BJ5813 RecA<sup>+</sup>(recombinasa positiva). Només aquells clons en els que hi hagi hagut recombinació entre els dos vectors creixeran al medi de selecció. És molt important en aquest pas comprovar l'absència de vector pKp1.4 $\Delta$ CMV parental mitjançant múltiples digestions amb enzims de restricció (Figura 76). Els vector obtinguts, d'expressió del shRNA contra la luciferasa i la PEPCK-C, es van anomenar pKp1.4-U6-Ff i pKp1.4-U6-664, respectivament. Un cop es té el genoma de l'adenovirus recombinant es fa una maxi-prep, es linealitzava amb PacI, mitjançant la incubació durant tota la nit (14-16 hores) a 25°C amb 10 U d'enzim/ $\mu$ g de DNA, i es purifica per precipitació en acetat sòdic.

### 3. Obtenció de les partícules virals

Per a la generació de partícules virals, les construccions definitives pKp1.4-U6-Ff i pKp1.4-U6-664, linealitzades amb Pacl i purificades, es van transfectar en cèl·lules empaquetadores HEK-293. Aquesta línia cel·lular complementa en trans els elements virals que manquen a les construccions pKp1.4, que no són replicatives per si soles, permetent així l'encapsidació del genoma viral i la generació de les partícules infectives. Es condensen 3 µg dels plasmidis amb PEI per a transfectar plaques de 6 cm a una confluència del 70-80%. Passades 80 hores (corresponent a dos cicles virals) es recullen les cèl·lules i el medi. Les cèl·lules productores es lisen amb tres cicles de congelació-descongelació, es centrifuga 3500-400 rpm 10 minuts i es recull el sobrenedant on hi ha les partícules virals, que es guarden a -80°C fins a la seva purificació.

### 4. Amplificació

L'amplificació de les partícules virals es realitzà mitjançant successives infeccions de les cèl·lules empaquetadores amb el lisat anterior, que conté les partícules virals. Una preparació estàndard correspon a una producció de 20 plaques de 15 cm de diàmetre. La infecció es realitza normalment quan les cèl·lules estan a una confluència del 90-100% en medi sense sèrum durant una hora. Passat aquest temps, s'aspira el medi i s'afegeix medi complet.

### 5. Purificació

Es fan dues rondes de purificació en columnes de gradient de CsCl<sub>2</sub> seguides d'una última purificació en columnes de Sephadex G25 (GE Healthcare).

### 6. Titulació

La titulació dels adenovirus es realitzà mitjançant dues metodologies. La primera valora la quantitat de partícules virals (viral particles, v.p.), quantificant el contingut proteic per espectofotometria. La segona valora les partícules infectives. (plaque forming units, p.f.u.), segons l'aparició de l'efecte citopàtic després de la infecció de cèl·lules HEK-293. A tal fi, s'infecten cèl·lules HEK-293 amb una dilució seriada de l'adenovirus recombinant (factor de dilució entre 10<sup>1</sup> i 10<sup>3</sup>) i s'observa l'aparició de l'efecte citopàtic (les cèl·lules apareixen arrodonides i birrefringents) durant les 36-48 hores següents. Aquella dilució que provoca efecte citopàtic al 100% de les cèl·lules és la que permet estimar el títol de la preparació segons la fórmula:

$$\frac{\text{N}^{\circ}\text{cèl·lules al pouet} * \text{dilució} * 10 \text{ pfu/cèl·lula}}{\text{Volum de la dilució emprat en la infecció}} = \text{títol (p.f.u./ml)}$$

Les titulacions obtingudes en els stocks virals emprats en els estudis inclosos en aquest treball són:

	v.p./ml	p.f.u./ml
AdU6-Ff	1.83 10 <sup>12</sup>	4.19 10 <sup>10</sup>
AdU6-664	1.33 10 <sup>12</sup>	5.64 10 <sup>10</sup>

### 7. Emmatzematge.

Els estocs virals s'han emmatzemat en PBS 1X, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 10% glicerol a -80°C en alíquotes de 50-100 µl.

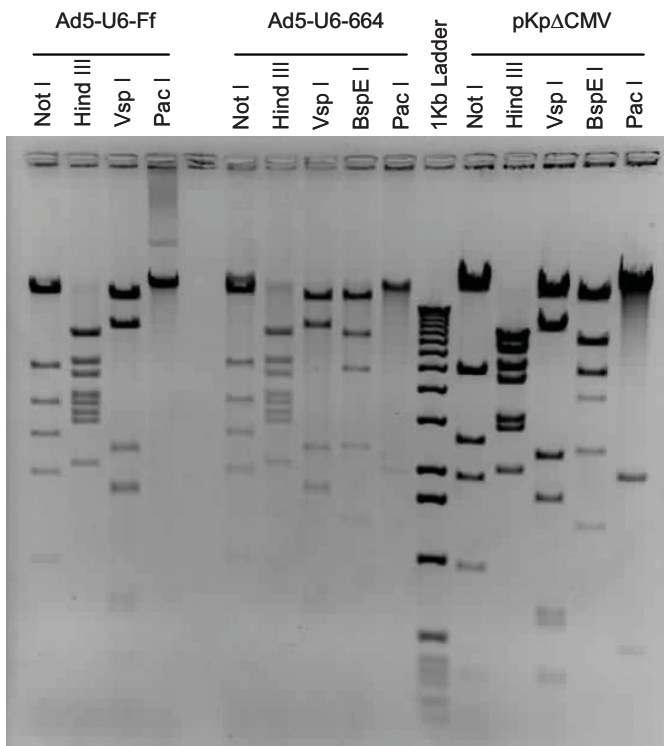


Figura 76. Patró de restricció de les construccions adenovíriques definitives per a Ad5 expressant el shRNA Ff (dirigit contra la luciferasa de Photinus pyralis) i 664 (dirigit contra PEPCCK-C).

## Preparació i anàlisi de RNA

La preparació d'RNA total s'ha realitzat a partir de teixit congelat immediatament després de la seva extracció en nitrogen líquid i posteriorment mantingut a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Alternativament, en el moment de la necròpsia, el teixit s'ha submergit en solució la estabilitzadora RNAlater (Quiagen) i conservat a  $4^{\circ}\text{C}$  fins a la extracció del RNA. Durant la purificació, la manipulació de l'RNA s'ha fet en fred (treballant sobre gel), amb material autoclavat i aigua tractada amb DEPC per a eliminar la possibilitat de degradació per RNases.

Per a l'extracció de RNA total per a la realització de Northern blot, es va homogeneïtzar una mostra de fetge de 100 mg de teixit hepàtic, en un polítró Polytron PT3000 (Kinematica) aplicant-hi 2 polsos de 10 segons a 10000 rpm en 1 ml de Ultraspec (Biotex), seguint les indicacions del fabricant.

Per a aplicacions de qRT-PCR l'extracció s'ha dut a terme amb el kit RNeasy mini Kit (Quiagen), ja que, tot i tenir un rendiment menor, proporciona un RNA de major puresa. En aquest cas, una peça d'uns 10-20 mg es va homogeneïtzar en un Potter (Bayer) aplicant-hi 2 polsos de 10" a 1500 rpm en 600  $\mu\text{l}$  de tampó RLT, i es van seguir les indicacions del kit. Addicionalment es va realitzar un tractament en columna amb DNAsa, seguint les indicacions del kit, per a evitar possibles contaminacions amb DNA genòmic que poguessin interferir amb la quantificació del mRNA.

A partir d'una dilució 1/50 de l'RNA es determina l'absorbància a  $\lambda = 260$  i es calcula la concentració de la mostra segons la fórmula:

$$[\text{RNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 40 / \mu\text{l RNA total}$$

La puresa de la preparació de RNA es valora segons la relació  $A_{260}/A_{280}$ . Una solució pura d'RNA té una  $A_{260}/A_{280} \geq 2$ . Relacions inferiors són indicatives de contaminació per proteïnes o substàncies aromàtiques (fenol, etc). La integritat del RNA es comprova per electroforesi en un gel desnaturalitzant d'agarosa a l'1.5% d'una alíquota (0,5-1  $\mu\text{g}$ ). Si el RNA no presenta degradació significativa, es poden diferenciar dues bandes definides corresponents a l'RNA ribosòmic 28S (4,8 Kb) i 18S (1,8 Kb).

### Anàlisi dels nivells de mRNA per Northern Blot

#### 1. Electroforesi en gels desnaturalitzants d'agarosa-formaldehid.

Per tal d'analitzar la integritat de l'RNA purificat, o com a primer pas de la detecció del mRNA desitjat per Northern blot, la mostra de RNA es desnaturalitza i separa en gels d'agarosa desnaturalitzants amb formaldehid.

- Preparació del gel 1,5 % agarosa/formaldehid:

	Vf	<u>50 ml</u>	<u>250 ml</u>
H2O		36 ml	144 ml
MOPS 10X		5 ml	25 ml
Agarosa		0.75 g	3.75 ml
Escalfar fins a dissoldre l'agarosa, deixar refredar fins 55-65°C i afegir:			
Formaldehid 37%		9 ml	45 ml

#### 2. Desnaturalització de la mostra d'RNA.

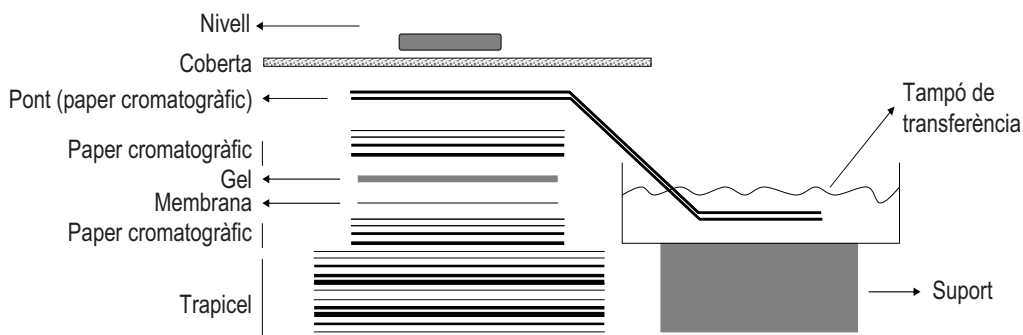
	<u>Gel analític</u>	<u>Gel Northern</u>
RNA	2 µl	25 µg
Tampó de mostra per RNA	10 µl	50 µl
Tampó de càrrega per RNA 10X	2 µl	5.5 µl

- Incubar 10 minuts a 65 °C per a defer estructures secundàries del RNA. Clavar immediatament els tubs en gel.
- Carregar el gel d'agarosa/formaldehid i dur a terme l'electroforesi a 20-25 V durant la nit (12-16 hores) o 70 V durant el dia (4-6 hores).

<b>MOPS 10X</b>	0.2 M MOPS, 50 mM Acetat sòdic, 5 mM EDTA
<b>Tampó de mostra per RNA</b>	6% formaldehid, 50% formamida desionitzada, 20mg/ml bromur d'etidi
<b>Tampó de càrrega 10X per RNA</b>	50% glicerol, 0.4% blau de bromofenol, 0.4% xilè cianol
<b>Tampó electroforesi</b>	MOPS 1X en H <sub>2</sub> O DEPC o autoclavada

#### 3. Transferència passiva alcalina invertida.

La transferència passiva alcalina invertida és una metodologia senzilla i ràpida per a transferir el mRNA del gel d'agarosa a la membrana de nilò o PVDF (Hibond-N<sup>+</sup>, Amersham). En aquest mètode de transferència el flux va de dalt cap a baix (Figura 77), fet que el converteix en molt més ràpid i eficient, permetent detectar bandes més delimitades i intenses.



**Figura 77. Muntatge per a la transferència passiva alcalina invertida**

S'ensambla el muntatge de transferència segons l'esquema que s'indica a la Figura 77. Les capes inferiors de paper seran seques, mentre que la membrana, gel i capes superiors de paper cromatogràfic (Whatman) i el pont s'humitegen amb tampó de transferència. Es cobreix sistema amb una plataforma de plàstic per a mantenir el sistema humit. No cal afegir cap pes a la part superior, però és important equilibrar el sistema amb un nivell i vigilar que el pont no contacti amb les capes de paper de sota el gel. La transferència es duu a terme durant quatre hores a temperatura ambient. Posteriorment es fixa l'RNA a la membrana a 80°C durant quinze minuts.

#### 4. Hibridació amb la sonda radioactiva

Prehibridació: s'utilitza la solució ULTRAhyb™ (Ambion) segons el protocol del fabricant.

Marcatge de la sonda: es va dur a terme seguint el protocol del kit comercial Random primer Rediprime II-Random Prime labeling system (Amersham Biosciences) utilitzant [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/ mmol). Es quantifica el marcatge mesurant les cpm que emet 1  $\mu$ l de sonda en un comptador beta.

Hibridació: 10<sup>6</sup> cpm/ml de sonda marcada s'afegeixen a la solució de prehibridació i s'incuben a 42°C 14-24 h.

Rentats: 2 X 5 min en 2X SSC, 0.1% SDS a 42°C

2 X 15 min en 0.1X SSC, 0.1% SDS a 42°C

SSC 20X	3M NaCl, 0.3 M Citrat sòdic, pH 7.4
Tampó de transferència	SSC 5X, 10mM NaOH

5. Detecció del marcatge radioactiu

Contacatar amb films fotogràfics Curix RP2 (Agfa) entre 6 i 24 hores a  $-80^{\circ}\text{C}$ , o amb membranes Phosphoimager (Bio Rad) durant 1-5 hores.

**Anàlisi dels nivells de mRNA per PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR)**

La qRT-PCR, per la seva sensibilitat i dinamisme s'ha convertit en la eina d'elecció per a quantificar RNA, fins i tot en aquells casos en que els nivells d'expressió són ínfims. El mètode es basa en la detecció de fluorocroms lligats a les sondes de forma simultània a l'amplificació, superant així les limitacions dels protocols de quantificació basats en la reacció de PCR a punt final. En aquest treball s'han emprat sondes TaqMan, que aprofiten l'activitat inherent 5'nucleasa de la Taq polimerasa, així com d'altres DNA polimerases. Les sondes contenen un fluoròfor (FAM) a l'extrem 5' i un quencher (TAMRA) al 3' (absorbeix la fluorescència del primer). Quan la sonda anella amb el cDNA cebador i la Taq comença l'amplificació, la sonda es degrada per l'activitat 5'→3' exonucleasa, separant el fluoròfor del quencher, resultant en un increment de la fluorescència, en una fase exponencial, fins a arribar a una saturació de la senyal, al punt final de la reacció. El número de còpies del cDNA a la reacció determina l'inici de la fase exponencial, fet que és aprofitat per a estimar el contingut de mRNA de la mostravalor, a partir de del valor ct. El ct correspon al cicle en el que s'inicia l'amplificació exponencial, per sobre d'un llindar detectable. Tot i que la tècnica permet la quantificació absoluta d'un determinat mRNA en termes de número de còpies (si es fa servir una recta patró), en la present tesi s'han determinat els valors relatius al tractament control, segons el càlcul de la  $\Delta\Delta\text{ct}$ . Així, els càlculs realitzats per a determinar del contingut de mRNA relatiu al grup control són:

$$\Delta\text{ct} = \text{ct gen problema} - \text{ct gen normalitzador}$$

$$\Delta\Delta\text{ct} = \Delta\text{ct mostra problema} - \Delta\text{ct mostra de referència}$$

$$\text{Quantitat relativa de mRNA} = 2^{(-\Delta\Delta\text{ct})}$$

L'amplificació dels mRNA es va realitzar en dos passos: 1) en un pas previ, el mRNA es retro-transcriu a cDNA i 2) el cDNA s'amplifica en els successius cicles de PCR.

1. Obtenció de cDNA per retro-transcripció del mRNA

S'utilitzà el kit comercial Rady-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Biosciences). A partir de 2  $\mu\text{g}$  de RNA, utilitzant hexàmers aleatoris com a sodes i seguint el protocol del fabricant, s'obté una població dels cDNA corresponents al RNA total de la mostra.



## 2. PCR a temps real

Els nivells dels mRNA d'interès es van detectar utilitzant el sistema Micro Fluidic Card (Applied Biosystems) en un aparell ABI PRISM® HT7900 Real Time Sequence Detection System (Applied Biosystems). La Micro Fluidic Card és una placa de 384 pouets que conté les sondes TaqMan incorporades. Les Micro Fluidic Card emprades en aquest estudi són d'una configuració 24x8x2, la qual permet amplificar 24 mRNAs (Taula 17) de 8 mostres individuals per duplicat.

Proteïna	Gen	Sonda TaqMan
Chrebp	Mlxipl	Mm00498811_m1
c-myc	Myc	Mm00487803_m1
GK	Gck	Mm00439129_m1
UCP 2	Ucp2	Mm00495907_g1
PFK2	Pfkfb3	Mm00504650_m1
EM	Mod1	Mm00782380_s1
cMDH	Mdh1	Mm00485106_m1
PGC-1 $\alpha$	Ppargc1a	Mm00447183_m1
HNF-4 $\alpha$	Hnf4	Mm00433964_m1
PEPCK-C	Pck1	Mm00440636_m1
OAS2	Oas2	Mm00460961_m1
18S	4342379-18S	4342379-18S
$\beta$ -2-m	B2m	Mm00437762_m1
Glut 2	Slc2a2	Mm00446224_m1
CPT1	Cpt1a	Mm00550438_m1
PPAR $\delta$	NULL	Mm00803186_g1
PPAR $\gamma$	Pparg	Mm00440945_m1
FAS	Fasn	Mm00662319_m1
SREBP-1c	Srebf1	Mm00550338_m1
G6Pasa	G6pc	Mm00839363_m1
HmgCoA Sintasa	Hmgcs2	Mm00550050_m1
Glutamina Sintasa	Glul	Mm00725701_s1
PPAR $\alpha$	Ppara	Mm00440939_m1
LXR $\alpha$	Nr1h3	Mm00443454_m1
HNF3 $\alpha$	Foxa3	Mm00484714_m1

**Taula 17. Sondes TaqMan emprades en les qRT-PCR**

---

## TÈCNiques DE CULTIU CEL·LULAR I EXPERIMENTS IN VITRO

---

### Línies cel·lulars

En els experiments in vitro es va fer servir la línia cel·lular d'hepatoma humà **Huh7**. Aquesta línia és altament glucolítica, amb una activitat gluconeogènica, i expressió de PEPCK-C pràcticament indetectables. A més, les cèl·lules Huh7 són permissives a l'hora de transfectar-les amb vectors catiónics i/o lipídics, fet que les converteix en una eina molt útil per a estudis de transferència gènica.

Medi de cultiu: Dulbecco's Modified Medium Glutamax (25 mM glucosa), (DMEM, GIBCO-BRL) suplementat amb 10% sèrum fetal boví (FBS, GIBCO-BRL), 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina i 100 µg/ml estreptomina.

Condicions de creixement: 37°C en atmosfera al 10% CO<sub>2</sub>.

Canviar el medi cada 2-3 dies.

Quan arriben a 100% de confluència, cal tripsinitzar-les i passar-les a una dilució 1:5-1:10.

### Transfeccions

Les transfeccions rutinàries es realitzaren amb PEI lineal 25 KDa (Aldrich, Cat# 40.872-7).

1. En el moment de la transfecció les cèl·lules han d'estar a un 60% de confluència.
2. Preparació del medi de transfecció:

25 µl de NaCl 150 mM per µg de DNA
------------------------------------

5 µl de PEI per µg de DNA
---------------------------

**Tub A-** Diluir el DNA en el volum adequat de NaCl 150 mM, i vortejar suaument.

**Tub B-** Diluir el PEI 5.47 mM en el volum adequat de NaCl 150mM i vortejar suaument.

3. Afegir els contingut del tub B sobre el tub A i vortejar immediatament. És molt important no invertir l'ordre i ser el més sistemàtic possible en el procediment, per a evitar variabilitat inter-experimental, ja que la mida i eficiència dels complexos resultants dependrà molt de les condicions d'agitació i incubació posteriors.
4. Incubar 10 minuts a temperatura ambient.

5. Fer dos rentats de les cèl·lules amb OPTI-MEM (Gibco-BRL), per tal d'eliminar el sèrum, ja que pot interferir en el procés de transfecció.
6. Posar OPTI-MEM de manera que el volum de transfecció sigui la meitat del de manteniment habitual.
7. Afegir la mescla de DNA/NaCl + PEI/NaCl a cada placa.
8. Agitar suaument la placa.
9. Incubar més o menys 4 hores (no més de 4 hores i mitja perquè si no la viabilitat de les cèl·lules disminueix molt).
10. Un cop passat aquest temps, hi ha dues opcions:
  - retirar el medi de transfecció i afegir 10 ml de DMEM (el qual conté sèrum). Deixar les plaques 48 hores a l'incubador.
  - afegir directament els 10 ml de DMEM. Passades 24 hores canviar el medi: afegir 10 ml de DMEM i deixar les plaques 24 hores a l'incubador.
11. L'anàlisi corresponent es fa, normalment, passades 48 hores de la transfecció.

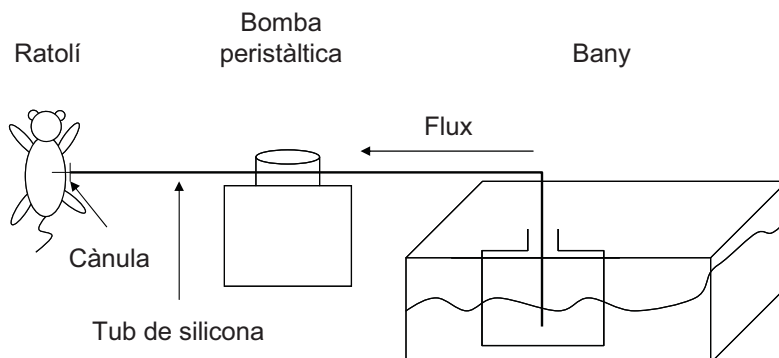
### **Obtenció d'hepatòcits de ratolí**

L'aïllament dels hepatòcits dels ratolins db/db ens va permetre estudiar la capacitat respiratòria dels hepatòcits intactes en presència o absència (parcial o total) de PEPCK-C, en sotmetre'ls a la tècnica de respirometria d'alta resolució. Alternativament, els hepatòcits aïllats es poden cultivar ex vivo per a estudiar altres processos metabòlics, ja que el cultiu primari d'hepatòcits manté gran part de les característiques bioquímiques que en l'animal tenien. La metodologia es basa en la perfusió del fetge amb una solució de colagenasa, que disgrega els hepatòcits. A continuació es descriu el procés seguit per a l'aïllament d'hepatòcits de ratolí:

#### **1. Sistema de perfusió**

Per al circuit de perfusió es van utilitzar tubs translúcids de silicona TYGON 3350 Silicone (Masterflex, ref: 96420-14), una bomba peristàtica Miniplus 3 (GILSON) i un bany (Figura 78).

Abans de començar, cal temperar els medis de pre-perfusió i perfusió, i regular que el flux i la temperatura del medi que surten per la cànula són els correctes. En el nostre sistema, vam ajustar el bany Maria a 50°C i un flux de 7 ml/min.



**Figura 78. Esquema del circuit de perfusió**

2. El ratolí s'anestesia amb isofluorane-buprenorfina.
3. Es col·loca sobre la taula d'operacions i es ruixa l'abdomen amb etanol 70% per tal d'evitar possibles infeccions. Es retira la pell de l'abdomen, es desinfecta la zona amb una solució iodada i es realitza una laparotomia. És important retirar tanta pell com sigui possible, sense danyar el diafragma, per a facilitar la manipulació, i evitar possibles contaminacions, en cas que es desitgi cultivar els hepatòcits a posteriori.
4. Es passa un fil de seda per sota la vena porta hepàtica i es deixa preparat per fer un nus.
5. S'inicia la circulació pel circuit amb medi de pre-perfusió i es procedeix a la canulació. Per a facilitar la canulació es realitza una petita incisió amb unes tisores petites, de punta fina i recta i el flux es baixa a uns 2 ml/min. Ràpidament, es canula la vena porta hepàtica amb una cànula tipus Londwel de tefló de 22G i es tanca fent un doble nus amb força amb la lligadura que hem deixat prèviament preparada a la vena porta. Per a una perfusió òptima de tots els lòbuls hepàtics, és important no introduir la cànula massa a prop del fetge. Si l'extrem de la cànula està massa proper al fetge, només alguns lòbuls es perfondran correctament.
6. Si la canulació ha estat correcta, el fetge es comença a inflar. Immediatament (si el fetge s'infla massa o durant massa estona, provocarem dany i la viabilitat dels hepatòcits no serà adequada), es talla la vena cava inferior (just per sota dels ronyons), per a permetre la sortida del flux. Veurem que el tot fetge perd el seu color vermellós a agafa un to més groguenc.
7. S'ajusta el flux a 7 ml/min i es manté la circulació del medi de pre-perfusió durant uns 5 minuts (aproximadament 35 ml). El medi ha de sortir net de sang.

8. Canviar a la solució de perfusió a la qual s'haurà addicionat Liberase Blendzyme (Roche) just abans de la perfusió. Liberase Blendzyme és una barreja de colagenasa i proteases neutrals que aporten una digestió suau i homogènia per a la dissociació dels teixits. Normalment es dissolen 35 mg de Liberase Blendzyme (0.23U/mg) en 100ml de solució de perfusió (aproximadament 0.08 U/ml). La perfusió es manté fins que el fetge té un aspecte brillant i esponjós, amb els lòbuls amb una forma arrodonida i es queda un petit solc en pressionar-los amb les pinces. El temps de perfusió sol ser al voltant dels 12-15 min, però pot variar segons l'activitat de la barreja Liberase Blendzyme i haurem d'aplicar el nostre criteri. Aturar el circuit quan es consideri que la perfusió està completada
9. S'extreu el fetge curosament, es posa sobre d'una placa de petri sobre gel i s'extreu la càpsula de Wilson.
10. Es disposa el fetge en un embut cobert d'una doble capa de gasa i es dispersa tirant-hi uns 35-50 ml de MEM sense  $\text{Ca}^{++}$  (GIBCO) pre-refredat en gel. Es recull l'elúit en un tub de plàstic estèril tipus Falcon submergit en gel.
11. Es centrifuga a 50 g durant 2 minuts i es descarta el sobrenedant. Es resuspèn en 35 ml de MEM sense  $\text{Ca}^{++}$  i es repeteix el procés quatre vegades.
12. Es resuspèn els hepatòcits en 15 ml de medi d'assaig.
13. Finalment, cal comprovar la viabilitat mitjançant la tinció amb blau de tripà: es fa una dilució 1:1 entre l'estoc de blau de tripà 0,4 % en NaCl i els hepatòcits, s'aplica una gota d'aquesta barreja a la cambra de Neubauer i s'observa immediatament sota el microscopi. Habitualment, la viabilitat obtinguda seguint aquest protocol oscil·la el 80%.

Medi de pre-perfusió	Medi de perfusió
Hank's BSS (Sigma) 9.5 g/l	Hank's BSS (Sigma) 9.5 g/l
HEPES 2.38 g/l	HEPES 2.38 g/l
EGTA 0.19 g/l	CaCl <sub>2</sub> 0.41 g/l
NaHCO <sub>3</sub> 0.35 g/l	NaHCO <sub>3</sub> 0.35 g/l
Ajustar el pH a 7.2 i esterilitzar per filtració. Emmagatzemar a 4°C	

### Respirometria d'alta resolució

La mesura polarogràfica del consum d'oxigen dels hepatòcits aïllats de ratolí s'ha dut a terme a 37°C amb un elèctrode d'oxigen d'alta resolució del tipus Oxygraph (Orboros, Austria) amb l'agitació fixada a 750 rpm. L'oxigen dissolt al medi d'incubació difon a través d'una membrana de tefló i es redueix en posar-se en contacte amb l'elèctrode de platí polaritzat a 0,6 V, generant-se un corrent

elèctric proporcional a l'activitat d'oxigen de la solució. El protocol complet es va finalitzar en un període de 50-60 minuts. Les mesures de concentració i consum d'oxigen es van emmagatzemar a intervals de 2 segons utilitzant un sistema d'adquisició de dades informatitzat (Datlab, Austria).

Medi gluconeogènic de respirometria
F-12 Coon's modification (SIGMA)
20 mM HEPE
20 mM lactat
2 mM glutamina
1 mM octanoat conjugat amb 0,5% BSA

S'ha utilitzat un medi de respirometria gluconeogènic, que conté substrats gluconeogènics (lactat i piruvat) i de  $\beta$ -oxidació (octanoat). Abans de començar les mesures, cal equilibrar el medi de respirometria amb aire a 37°C i agitació a 750 rpm, fins que s'obté una senyal estable per a la calibració en condicions saturants d'aire. A partir d'aquest moment es pot introduir la mostra i començar les mesures.

En el nostre cas, es van resuspendre 50000 hepatòcits en un volum final de 2 ml de medi de respirometria. Les mesures dels diferents estats de la cadena de transport d'electrons es van realitzar afegint, mitjançant la punció amb una xeringa Gilson, diferents drogues de manera successiva tal i com es detalla a continuació:

- **Rutina:** respiració basal en medi de respirometria.
- **Respiració desacoblada:** respiració en presència d'oligomicina 1  $\mu$ g/ml. L'oligomicina inhibeix la ATP sintasa.
- **Respiració totalment desacoblada:** s'inicia amb l'addició del desacobrador FCCP (carbonil cianida p-trifluorometoxifenil-hidrazona) 1  $\mu$ M.
- **Aturada de la respiració:** s'aconsegueix amb l'addició de 5  $\mu$ M antimicina A.
- **COX:** finalment, l'activitat citocrom c oxidasa (COX) ( $J_{COX}$ ) es va mesurar en presència de 2mM ascorbat/500 $\mu$ M TMPD. L'activitat COX es va fer servir com a normalitzador intern de les mesures anteriors de respiració.

A partir d'aquestes dades crues es van calcular els índex respiratoris (227) que es detallen a continuació:

- Relació de control respiratori (**RCR**): és un indicador de la quantitat de respiració desacoblada i es calcula fent el quocient entre la respiració totalment desacoblada (FCCP) i la respiració en presència d'oligomicina.

- Relació de control desacoblat (**UCR**): és una estimació de la capacitat respiratòria de reserva que es calcula com el quocient entre FCCP i RUTINA.
- Relació de control de la fosforilació respiratòria (**RCRP**): ens indica la proporció de capacitat respiratòria aplicada a la síntesi d'ATP, i es calcula com a la diferència entre la respiració amb oligomicina i la respiració rutina i dividint per la respiració FCCP.

---

## ANÀLISI DE LES PROTEÏNES

---

### Preparació d'homogenats

Per a la obtenció d'extractes per a la posterior mesura de l'activitat enzimàtica és necessari obtenir **homogenats en condicions no desnaturalitzants**, en que els tampons utilitzats preservin la integritat dels enzims i mantinguin unes condicions fisiològiques. En aquest cas, els tampons a utilitzar són els adequats per a l'activitat enzimàtica que es vulgui analitzar a posteriori.

Quan l'objectiu ha estat detectar l'anàlisi del contingut proteic (inclosa la detecció de fosforilacions, per Western blot), s'ha obtingut **homogenats en condicions desnaturalitzants** utilitzant un tampó RIPA (que conté inhibidors de fosfatases) suplementat amb inhibidors de proteases a una concentració final 1X, seguint el mateix protocol que per als extractes no desnaturalitzants.

RIPA	Inhibidors de proteases (100X)	Altres inhibidors (100X)
50 mM Tris-HCl, pH 7,4	100 µg/ml Pepstatina	100 mM PMSF
1% Triton X100	100 µg/ml Aprotinina	
1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	100 µg/ml Leupeptina	
50 mM NaF	100 µg/ml Benzamidina	
5 mM EDTA		
40 mM β-glicerofosfat		
100 mM NaCl		

### Obtenció d'homogenats totals a partir de cèl·lules en cultiu

1. Disposar les plaques en gel, aspirar el medi i realitzar dos rentats amb PBS 1X pre-refredat
2. Afegir el volum desitjat de tampó d'homogeneïtzació (uns 300 µl per a una placa de 10 cm de diàmetre).
3. Lisar les cèl·lules realitzant tres cicles de congelació-descongelació.
4. Centrifugar a 10000 g durant 20 minuts i a 4°C.
5. Recuperar el sobrenedant (fracció soluble).

### Obtenció d'homogenats totals a partir de teixit

1. Els teixits (fetges, ronyons, músculs o teixit adipós) un cop realitzada la necròpsia, es mantenen a -80°C. Es recullen mostres, que fins al moment de l'homogeneïtzació es mantenen submergides en N<sub>2</sub> líquid.



2. Es pesen els teixits (evitant que es descongelin) i s'apunta els mg que fa cada peça. Habitualment s'agafen peces d'entre 50 i 100 mg.
3. Homogeneïtzació en 9 volums de tampó d'homogeneïtzació pre-refredat. La composició del tampó homogeneïtzació variarà segons l'assaig que es vulgui realitzar. És molt important mantenir les mostres fredes en tot moment submergint el tub en gel per a preservar l'activitat enzimàtica. Depenent de la consistència del teixit la homogeneïtzació s'han aplicat diferents metodologies:
  - En teixits tous (teixit adipós i fetge): les mostres s'han homogeneïtzat en un Potter (Bayer), aplicant 10 polsos a 1500 rpm.
  - Els teixits més fibrosos (múscul i ronyó): cal un mètode més agressiu, com és el politró. En aquest estudi s'ha utilitzat un Polytron PT3000 (Kinematica). Es realitzen tres pols de 10000 rpm durant 10''aproximadament.
4. Centrifugar a 20000 g durant 15 minuts a 4°C.
5. Recuperar el sobrenedant (fracció soluble).

#### **Obtenció de la fracció nuclear a partir de teixit congelat**

Per a la immunodetecció d'alguns factors de transcripció (com PGC-1 $\alpha$ ) en fetge s'ha obtingut la fracció nuclear a partir dels extractes en tampó RIPA seguint els següents passos:

1. Es recupera el pellet de la centrifugació en el protocol d'obtenció d'extractes totals (punt 4) i es resuspèn en tampó hipertònic, per a lisar els nuclis.
2. Es vorteja i es deixa incubar en gel durant 30 minuts.
3. Es centrifugar a 20000 g durant 15 minuts a 4°C.
4. Es recupera el sobrenedant (fracció nuclear).

#### **Separació de la fracció citosòlica i membranosa de fetge**

Per a l'estimació de l'activació de PKC $\epsilon$  al fetge per l'acumulació de lípids es va quantificar la translocació del citosol a la membrana plasmàtica. Per a tal fi, es va immunodetectar PKC $\epsilon$  a la fracció citosòlica i membranosa. Ambdues fraccions es van separar seguint els següents passos, a partir dels homogenats de fetge en tampó RIPA (punt 3 del protocol d'obtenció d'homogenats totals a partir de teixit):

1. Els homogenats es centrifuguen a 800 g durant 10 minuts.
2. Es recupera el sobrenedant i es sotmet a una ultracentrifugació de 100000 g durant 1 hora a 4°C.

3. Es separen el sobrenedant (fracció citosòlica) i el pellet (fracció nuclear).

### Valoració de la concentració de proteïna als homogenats

Cal tenir un patró de BSA amb el mateix tampó en el que es tenen les mostres (d'entre 0 i 5 µg/µl, per a estar dins del rang e linealitat del mètode), que es pot guardar a -20°C i reutilitzar.

De manera generalitzada, quan el tampó conté SDS, el mètode d'elecció és el BCA, mentre que si conté agents reductors, resulta més convenient el mètode Bradford.

#### Mètode BCA

El reactiu de BCA es prepara al moment, barrejant les solucions A i B segons la raó 50:1.

1. En una placa ELISA de 96 pouets, es posca a cada pouet, per triplicat:
  - 3 µl de patró de BSA + 200 µl BCA
  - 3 µl de mostra + 200 µl BCA
2. S'incuba a 37°C durant 30-120 minuts i es realitza la lectura de l'absorvència a λ 550 nm.

#### Mètode Bradford

El reactiu de Bradford s'utilitza diluït 1:5 en aigua.

1. En una placa ELISA, de 96 pouets, es posca en cada pouet, per triplicat:
  - 2 µl de patró de BSA + 200 µl Bradford
  - 2 µl de mostra + 200 µl Bradford
2. Es deixa la placa a temperatura ambient de 5 a 10 minuts i es realitza la lectura de l'absorvència a λ 620 nm.

### Anàlisi de proteïnes per Western Blot

1. Preparació de les mostres

Tampó de càrrega 4X
Tris-HCl 200 mM pH:6.8
40% glicerol
8% SDS
20% β-mercaptoetanol
0.8% Blau de bromofenol

El contingut proteic dels extractes es quantifica i iguala en quantitat de proteïna i volum final, es tracta en condicions reductores i desnaturalitzants amb el tampó de càrrega a una concentració final 1X i s'escalfa a 95°C 5 minuts.

## 2. Separació de proteïnes per SDS-PAGE

S'ha utilitzat el kit Mini Protean III (Bio-Rad).

Tampó d'electroforesi
Tris 30.3 g/L
Glicina 144 g/L
SDS 20% 50 ml
pH 8.3

Gel separador: el gel separador es prepara a un percentatge d'acrilamida:bisacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 37.5:1, Bio-Rad) que oscil·la entre un 8 i 12%. A major mida de la proteïna a analitzar es requereix menor concentració d'acrilamida:disacrilamida per a aconseguir una bona separació. Depenent de la proteïna a detectar i les condicions experimentals, s'han carregat entre 10 i 50 µg de proteïna. Un cop carregades les mostres en els pouets del gel concentrador es duu a terme l'electroforesi a 130 V durant aproximadament 90 minuts o fins que el front de Blau de Bromofenol surt del gel.

## 3. Electrotransferència

S'ha utilitzat membranes de PVDF (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA). La transferència s'ha dut a terme de forma general a 400 mA durant 90 minuts, o durant la nit a 15 V (14-16 hores) en tampó de transferència 1X amb un 10% de metanol.

Tampó de transferència 10X
Tampó transferència 10X:
Tris 30.3 g/L
Glicina 144 g/L

En qualsevol cas, sempre a la cambra freda i en agitació per a evitar escalfaments de les membranes que puguin danyar les proteïnes.

#### 4. Immunodetecció

Bloquejar la membrana amb TBS-T 1X 5% llet desnatada una hora a temperatura ambient. El percentatge de Tween 20 que s'ha utilitzat en aquesta tesi, ha variat entre el 0.05% (menys astringent) i el 0.5% (més astringent), en funció l'afinitat i/o especificitat de l'anticòs a utilitzar.

Incubar les membranes amb la dilució adequada d'anticòs (en una solució de TBS-T 5% llet o BSA 0.05% Azida sòdica) (Taula 18) durant dues hores a temperatura ambient o bé durant la nit (o durant el cap de setmana) a 4°C. La solució d'anticòs primari es recicla mentre sigui funcional.

Rentar les membranes amb un volum petit de TBS-T 1X. Es fa un rentat ràpid i tres de 10 minuts en agitació.

Incubar les membranes amb anticòs secundari diluït en TBS-T (1/5000-1/20000) durant una hora a temperatura ambient. Aquest anticòs detecta IgG de l'espècie en que s'ha generat el primari.

Rentar les membranes amb un volum petit de TBS-T 1X. Es fa un rentat ràpid i tres de 10 minuts en agitació. Es fa un rentat final de TBS durant 10 minuts.

TBS 20X
Tris-HCl 200 mM
NaCl 3 M
pH 7.4

#### Revel·lat

L'anticòs secundari està conjugat a l'enzim peroxidasa de rave (HRP), que permet visualitzar les bandes corresponents a les proteïnes que el primari reconeix gràcies a la generació d'un producte quimioluminiscent quan s'incuba durant un minut amb una barreja 1:1 dels reactius de ECL Western Blotting Detection Reagents, (Amersham Biosciences). El revelat es duu a terme contactant les membranes amb pel·lícules fotogràfiques (CurixRP2, Agfa) durant un temps variable i utilitzant líquids tradicionals de revelat i fixat. Alternativament, es realitza revelat digital en un equip d'imatge Fujifilm LAS 3000 Intelligent Dark Box IV.

#### Densitometria

L'estimació quantitativa de les proteïnes es realitza per anàlisi densitomètric dels films mitjançant el programa Quantity One, quan el revelat s'ha dut a terme en pel·lícules fotogràfiques, o a través del programa Multi Gauge, en el cas de revelat es digital. Els resultats són sempre expressats com a unitats arbitràries (relació entre la intensitat ajustada de la banda de la proteïna en estudi i de la proteïna normalitzadora).

	Dilució	Origen	Mida (kDa)	Proveïdor
ACC	1/2000	C	257 ( $\alpha$ )/280( $\beta$ )	Upstate
ACC-P Ser-79	1/2000	C	257	Upstate
AKT	1/400	Ca	60	Sta. Cruz <sup>o</sup>
AKT-P Ser 473	1/1000	C	60	Cell Signalling
AKT-P Thr 308	1/1000	C	60	Cell Signalling
AMPK $\alpha$	1/1000	C	62	Cell Signalling
AMPK-P Thr 172	1/1000	C	62	Cell Signalling
Chrebp	1/1000	C	95	Novus Biologicals
EGFR	1/1000	C	175	Dr. Jose Luis Rosa
eIF2 $\alpha$	1/1000	C	40	Cell Signalling
eIF2 $\alpha$ -P Ser 52	1/1000	C	40	Calbiochem
FAS (C-20)	1/500	Ca	272	Sta. Cruz
FOXO1	1/250	C	82	Sta. Cruz
FOXO1-P Ser 256	1/250	C	82	Cell Signalling
GK (H-88)	1/500	C	52	Sta. Cruz
L-PK	1/1000	C	60	Dr. Ramon Bartrons
MAPK (p42)	1/100	C	42	Dr. Francesc Viñals
PEPCK-C	1/20000	O	69	Dr. Daryl Granner
PGC-1 $\alpha$	1/250	C	91	Cell Signalling
PKC $\epsilon$ (C-15)	1/500	C	82	Sta. Cruz
Sirt-1	1/1000	C	110	Upstate
SOD-1	1/1000	R	37	Novacastra
SOD-2	1/1000	C	20	Dr. Isidre Ferrer
SREBP1 (H-160)	1/1000	C	125/68	Sta. Cruz
$\alpha$ -tubulina	1/4000	R	50	Sigma
$\gamma$ -tubulina	1/10000	R	48	Sigma
VDAC	1/1000	R	32	Dra. Aurora Pujol

**Taula 18. Anticossos primaris utilitzats.** C=,conill; Ca,Cabra; O, ovella; R=,ratolí,.

---

## TÈCNiques HISTOLÒGiques

---

### **Preparació de mostres histològiques**

En aquest treball s'han aplicat dues tècniques diferents per a obtenir seccions per a realitzar les tècniques d'histologia. La primera, basada en la perfusió de l'animal amb una solució fixadora per a la posterior obtenció de seccions de 50  $\mu\text{m}$  en un vibràtom. La segona, basada en la fixació del teixit *ex vivo*, per a la obtenció de crioseccions de 7  $\mu\text{m}$ . A continuació es detallen ambdós procediments:

#### **Obtenció de seccions de 50 $\mu\text{m}$**

Per a la doble visualització de GFP i PEPCK-C en els fetges dels ratolins injectats amb la transferència gènica hidrodinàmica es van obtenir seccions de 50  $\mu\text{m}$  tal i com es detalla a continuació:

1. Els ratolins s'anestesien amb ketamina:xilacina.
2. Es realitza la laparotomia i s'exposa el tòrax.
3. Es perfora el ratolí amb una solució de PBS 1X Heparina 0,05% mitjançant la punció del ventricle esquerre amb una agulla epicranial (palometa) 25G connectada a un sistema d'infusió. El flux es controla mitjançant una clau de pas. De seguida que veiem que hi ha flux, es perfora l'aurícula dreta.
4. Seguidament, es fa una segona perfusió amb uns 20 ml de PBS 1X, 4% paraformaldehid.
5. Per a completar la fixació dels teixits, es deixen peces de fetge i ronyó durant tota la nit a 4°C en PBS 1X- 4% paraformaldehid.
6. A partir de les peces de teixit fixades en PBS-4% paraformaldehid es tallen seccions de 50  $\mu\text{m}$  en un vibràtom (Leica VT 1000).
7. Les seccions es submergeixen en solució de criopreservació (34.5% glicerol, 30% etilenglicol, en PBS 1X) i es tenen durant 1 hora (perquè s'impregnin bé) abans de guardar-les a -20°C.

#### **Obtenció de crioseccions de 7 $\mu\text{m}$**

La immunohistoquímica de PEPCK-C i la tinció de lípids en els ratolins db/db infectats amb adenovirus recombinants es va realitzar sobre crioseccions de 7  $\mu\text{m}$ , que van ser obtingudes tal com es detalla a continuació:

1. En la necròpsia, es pren una porció del tercer lòbul hepàtic (Figura 80) i es submergeix en una solució del 4% PFA en PBS durant, almenys, 24 hores per a la seva fixació completa.
2. La peça s'equilibra en una solució 30% sacarosa en PBS 1X durant una nit a 4°C.
3. S'inclou la peça en motlles Cryomold amb Tissue-Tek OCT™ compound (Sakura) i es congela per flotació sobre una placa petri en un bany de N<sub>2</sub> líquid.
4. Els motlles es guarden a -80°C fins a la obtenció de seccions de 7µm en un criostat.
5. Les crioseccions s'emmagatzemen a -20°C.

### **Immunohistoquímica de PEPCK-C**

Quan es parteix de les seccions de 50 µm les incubacions es realitzen en plaques TPP de 24 pouets en un volum final de 300 µl. Quan es parteix de crioseccions, les incubacions es realitzen directament sobre el porta-objectes.

1. Es recuperen les seccions -20°C. Si es tracta de crioseccions en porta-objectes es deixen assecar bé (una hora o més) per a que s'hi adhereixin bé. Es fa un rentat ràpid i dos rentats de 20 minuts en PBS 1X.
2. Bloqueig impermeabilització: incubar 2 hores en PBS 1X, 0.3% Tritó X-100, 20% FCS.
3. Incubació amb l'anticòs primari anti-PEPCK-C 1/10000 en PBS 1X, 1% Tritó X-100, 1% FCS durant 48 hores a 4°C en agitació lenta. A més, es duen es paral·lel dos controls negatius: un en el que en els que no hi incubem anticòs i un altre en el que hi posem una dilució equivalent de sèrum d'ovella (animal en el que s'ha produït el anticòs contra PEPCK).
4. Quatre rentats de 10 minuts amb PBS 1X a temperatura ambient.
5. Incubació amb l'anticòs secundari: IgG anti-ovella conjugat a Alexa Fluor 456 (Molecular Probes) a una dilució 1/200 en PBS 1X, 1% Tritó X-100, 1% FCS durant dues hores a 4°C a baixa agitació. Aquest punt, i els propers s'han de fer protegint la mostra de la llum en tot moment per tal de preservar la fluorescència.
6. Quatre rentats de 10 minuts amb PBS 1X a 4°C.
7. Muntatge: s'utilitza Mowiol com a medi de muntatge. L'òptim de fluorescència s'obté entre 12 i 24 hores després del muntatge.
8. Les preparacions es van analitzar per microscopia confocal als Serveis Científico-Tècnics de la Unitat de Biologia del Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona. S'analitzaren

cinc camps escollits de manera aleatòria d'augment 200X per cada secció en un microscopi confocal.

### **Tinció de lípids**

Els lípids es van visualitzar mitjançant el mètode d'Oil red. Aquest mètode tenyeix lípids neutres, permetent visualitzar tant triacilglicèrids com àcids grassos. La detecció de lípids amb Oil red s'ha realitzat sobre les crioseccions de 7 µm seguint el següent protocol:

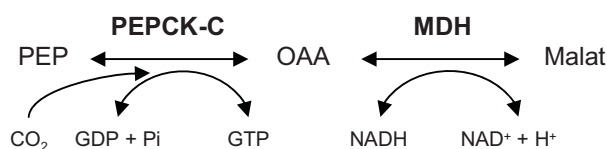
1. Es recuperen les seccions -20°C, es deixen assecar bé (una hora o més) i es renten PBS 1X.
2. Es fan dos rentats de 10 minuts en H<sub>2</sub>O.
3. Es fa una immersió en isopropanol 60%.
4. S'incuba en la solució de treball Oil red (0.3% Oil red en 60% isopropanol) durant 20 minuts a temperatura ambient.
5. Es diferencia per immersió en isopropanol 60%.
6. Seguidament, es fan dos rentats amb H<sub>2</sub>O de 20 minuts a temperatura ambient.
7. Es contrasten els nuclis tenyint durant 5 minuts amb hematoxilina a temperatura ambient.
8. Es renta sota el corrent d'aigua de l'aixeta durant 10 minuts.
9. Les mostres es monten en Mowiol.
10. Les mostres s'observen en un microscopi de camp clar.



## DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES

### Activitat PEPCCK

La mesura de l'activitat PEPCCK en cèl·lules en cultiu o en teixit hepàtic es va realitzar mitjançant una reacció acoblada a la malat deshidrogenasa (Figura 79), segons ha descrit prèviament Petrescu et al. (258).



**Figura 79. Reaccions acoblades a l'assaig d'activitat PEPCCK.**

- Es preparen homogenats totals de fetge en tampó d'homogeneïtzació PEPCCK (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2.5 mM DTT, 0.1% Tritó X100).
- Es preparen dos sets de tampó de reacció; un contenint  $\text{NaHCO}_3$  (+ $\text{NaHCO}_3$ , que es gasejarà) i l'altre sense (- $\text{NaHCO}_3$ , que no es gasejarà). El primer tampó servirà per la mesura de l'activitat PEPCCK més altres reaccions inespecífiques. El segon es una mesura de les reaccions inespecífiques. Els tampons de reacció es preparen seguint l'ordre descrit a la taula següent:

Tampó de reacció		Comentaris
Tris – HCl	50mM	
$\text{NaHCO}_3$	20mM	En un set de reaccions no s'afegeix
$\text{MnCl}_2$	1mM	
Gasejar amb $\text{CO}_2$ durant dos minuts (només en el set que conté $\text{NaHCO}_3$ )		
Rotenona	2ug/cubeta	Inhibeix la NADH deshidrogenasa
PEP	0,5mM	Preparar fresc
NADH	0,1mM	Preparar fresc
MDH	2IU/cubeta	

- Es prepara el set de cubetes amb: 25  $\mu\text{l}$  de l'homogenat + 965  $\mu\text{l}$  de tampó de reacció ( $V_f=990 \mu\text{l}$ ).

4. S'inicia la reacció enzimàtica, afegint 10  $\mu$ l dGDP (stock 0.2 mM guardat a  $-20^{\circ}\text{C}$ ), completant un  $V_f=1$  ml, a  $25^{\circ}\text{C}$
5. Immediatament s'inicia la lectura a  $\lambda$  340 nm durant 5 min cada 10 segons en un espectrofotòmetre DU 800 Beckman Coulter. Si hi ha activitat PEPCK detectable es perfila una pendent negativa, degut a la desaparició de NADH.
6. Per a calcular l'activitat PEPCK de cada mostra es resta la pendent de la reacció en el tampó  $-\text{NaHCO}_3$  a la pendent obtinguda en el tampó  $+\text{NaHCO}_3$ . L'activitat específica (mU/mg prot) es calcula a partir del coeficient d'extinció molar ( $\epsilon$ ) del NADH (6,22  $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ ) i corregint pel contingut proteic de l'extracte.

### **Activitat caspasa 3**

Les caspases són cistein-proteases que poden ser activades per proteòlisi. Alguns dels membres de la família de les caspases estan implicades en apoptosi. La caspasa 3 és una proteïna efectora implicada en les fases tardanes de l'apoptosi. La seva activació per proteòlisi per altres caspases iniciadores li confereix, al seu temps, activitat proteolítica per a actuar sobre diferents substrats cel·lulars.

Per a la determinació de l'activitat caspasa 3 en teixit hepàtic les mostres s'homogeneïtzen en tampó d'homogeneïtzació per caspasa 3 seguint el protocol descrit anteriorment. L'activitat caspasa 3 es llavors determinada en el sobrenedant utilitzant el substrat fluorogènic de caspasa-3 Ac-DEVD-AMC seguint els següents passos:

1. Es quantifica el contingut proteic de la mostra per BCA (Pierce).
2. Es dilueixen les mostres en tampó de reacció caspasa-3 per tal de tenir 20  $\mu\text{g}$  en 25  $\mu\text{l}$ .
3. Reacció:                    20  $\mu\text{g}$  mostra  
                                      2  $\mu\text{l}$  de substrat Ac-DEVD-AMC resuspès en DMSO 1mg/ml  
                                      123  $\mu\text{l}$  tampó de reacció 1X

S'incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  dues hores protegit de la llum.

4. L'alliberament de AMC (fluorocrom) degut a la proteòlisi per caspasa 3 es mesura en un fluorímetre de microplaques (Bio-Tek, Winooski, VT) a una  $\lambda$  d'excitació de 380 nm i d'emissió de 440 nm.
5. Es defineix una unitat d'activitat caspasa 3 com a la quantitat d'enzim actiu necessari per a produir l'increment d'una unitat arbitrària de luminiscència en dues hores de reacció.

Tampó d'homogeneïtzació caspasa 3	Tampó de reacció caspasa 3
Tris-HCl 5 mM pH 8	20 mM HEPES pH 7.5)
20 mM EDTA	10% glicerol
0.5% Tritó X-100	2 mM DTT

## Determinació de paràmetres sèrics

### Determinació de glucosa

Els nivells de glucosa sèrics es determinen a partir d'una gota de sang dels ratolins obtinguda de l'extrem de la cua. Es va fer servir el sistema Glucocard Memory 2 (Menarini).

### Determinació d'insulina

La insulina en sèrum es determinà per ELISA (Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA, Bender MedSystems) seguint les indicacions del fabricant. S'utilitzen 5 µl per a animals sans i diabètics tipus II (db/db) i 25 µl per a animals diabetis experimental induïda amb STZ.

### Determinació de Glutamat Piruvat Ttransaminasa (GPT) E.C. 2.6.1.2. sèrica

La Glutamat Piruvat Ttransaminasa (GPT) és un enzim hepàtic. En situacions de dany hepàtic l'enzim és alliberat al corrent sanguini, augmentant-te les concentracions. La mesura d'aquest enzim és, de fet, utilitzada en el diagnòstic de determinades malalties hepàtiques com hepatitis o cirrosi. La mesura dels nivells de GPT en els sèrums dels ratolins es va fer utilitzant les tires reactives de l'autoanalitzador Reflotron®. S'hi va aplicar una dilució 1/8 del sèrum en PBS1X.

### Determinació d'àcids grassos no esterificats (AGL), Triglicèrids (TAG), β-Hidroxibutirat (β-HBA), colesterol i lactat.

Aquestes mesures van ser fetes al servei de Bioquímica Clínica Veterinària de la facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona utilitzant un autoanalitzador COBAS-MIRA.

### Determinació del colesterol HDL

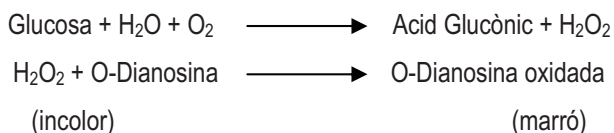
La mesura dels nivells del colesterol HDL en els sèrums dels ratolins es va fer utilitzant les tires reactives de l'autoanalitzador Reflotron®. S'hi va aplicar una dilució 1/8 del sèrum en PBS1X.

## **Determinació de metabòlits hepàtics**

### **Glicogen**

Els dipòsits hepàtics de glicogen es van quantificar seguint un mètode basat en la precipitació bàsica del glicogen, seguida de una hidròlisi àcida per a, finalment quantificar la glucosa alliberada. El procediment es el següent:

1. Es pren una peça de fetge de  $-80^{\circ}\text{C}$  d'entre 50 i 60 mg, es pesa i s'anota el pes exacte. Durant aquest procés, per a evitar la descongelació, les peces es mantenen en Eppendorf submergits en  $\text{N}_2$  líquid.
2. Es posa en un tub tipus Falcon de 15 ml 0.5 ml de 30% KOH i hi tirem la peça.
3. Es bull (bany Maria) durant 1 o 2 hores. Aquesta extracció alcalina ens permet separar el glicogen de la glucosa exògena en el posterior pas de precipitació amb etanol.
4. Deixar atemperar.
5. Afegir 5 ml d'etanol 100% i seguidament 10  $\mu\text{l}$  de LiCl 4M.
6. Vortejar i deixar precipitar durant la nit a  $4^{\circ}\text{C}$ .
7. Centrifugar 30 minuts a 3000 g. Descartar el sobrenedant. Al precipitat es troba el glicogen.
8. Resuspendre 0.5 ml de HCl 4M.
9. Bullir les mostres entre 30 i 90 minuts per a resolubilitzar.
10. Deixar atemperar i neutralitzar amb 0.5 ml de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  4M. Es comprova que el pH estigui entre 6.5 i 7.5 amb tires indicadores.
11. La concentració de glucosa alliberada per la hidròlisi àcida es mesura fent servir un kit de mesura de glucosa (Sigma) basat en l'acoblament de les següents reaccions enzimàtiques:



La intensitat de la coloració es mesura a  $\lambda$  492 nm en un lector de plaques ELISA SLT 340 ATC i és proporcional a la concentració de glucosa.

### **TAG i àcids grassos hepàtics**

El contingut de triglicèrids en fetge es quantificat seguint un procediment basat en el mètode de saponificació hepàtica de Salmon i Flatt (259) segons el següent protocol:

1. Es pesen peces de fetge (conservat a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) de 100-200 mg i s'anota el pes. Durant aquest procés, per a evitar la descongelació, les peces es mantenen en tubs tipus Eppendorf submergits en  $\text{N}_2$  líquid.
2. S'afegeix el mateix volum (mg/ $\mu\text{l}$ ) de 3M KOH (en 65% etanol) i es vorteja vigorosament per a assegurar que tota la peça queda ben impregnada i al fons del tub Eppendorf.
3. S'inicia la digestió bàsica incubant a  $70^{\circ}\text{C}$  durant una hora i continuar-la deixant les mostres a temperatura ambient durant la nit en agitació, vortejant periòdicament.
4. L'endemà, diluir les mostres de manera que la concentració final sigui 100 mg de teixit en 500 ml de Tris-HCl 50 mM. Per a això utilitzem un estoc 2M de Tris-HCl.
5. Finalment, es mesura:
  - a. La concentració de TAG en l'homogenat, utilitzant el kit Triglyceride (GPO-Trinder) de Sigma, basat en una sèrie de reaccions acoblades: digenstió dels TAG per la lipoproteïna lipasa seguida de successives digestions catalitzades per la glicerol quinasa (GliK), glicerol fosfat oxidasa (GPO) i peroxidasa (POD). El producte final és un cromòfor, que es pot quantificar espectrofotomètricament. La intensitat de la coloració es mesura a  $\lambda$  550 nm en un lector de plaques ELISA SLT 340 ATC i és proporcional a la concentració de TAG.
  - b. La concentració d'àcids grassos lliures en l'homogenat, utilitzant el kit NEFA C ACS-ACOD Method (Wako), assumint que detectarem tant àcids grassos lliures com provinents del TAG. Per tant, per cada mol de TAG hi haurà un mol d'àcids grassos associats, que es resta a la quantitat total d'àcids grassos hepàtics detectats.

### **Nucleòtids intracel·lulars (ATP, ADP, AMP)**

La quantificació dels nucleòtids intrahepàtics es va realitzar per HPLC a les instal·lacions dels Serveis Científic-Tècnics del Campus de Pedralbes, Universitat de Barcelona, seguint el protocol següent:

1. S'obtenen homogenats hepàtics en 10%  $\text{HClO}_4$ . Tot el procés es duu a terme en fred.
2. Es neutralitzen els extractes amb  $\text{K}_2\text{CO}_3$  5M.
3. Els extractes es clarifiquen en columnes Ultra Free-MC NMWL 10000 (Millipore), centrifugant a 12000 g durant 30 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$ .
4. Les mostres es guarden a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins a l'anàlisi.

5. L'anàlisi dels nucleòtids es va realitzar injectant 40 µl mostra en una columna d'intercanvi iònic Whatman Partisil 10-SAX i aplicant un gradient lineal de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  5 mM, pH 2,5 (tampó A) i  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  500 mM, pH 3,9 (tampó B). El gradient es va realitzar de 0% a 100% de tampó B, desenvolupant-se durant un període de 40 minuts a un flux de 1 ml/min.

### **Acil-CoA de cadena curta**

El contingut hepàtic d'acilsCoA de cadena curta (acetil-CoA, malonil-CoA, propionil-CoA, succinil-CoA) es va analitzar per HPLC a les instal·lacions dels Serveis Científic-Tècnics del Campus de Pedralbes, Universitat de Barcelona, tal i com està descrit a la bibliografia (260). La obtenció dels extractes es descriu a continuació:

1. S'obtenen homogenats hepàtics en 5% àcid sulfosalicílic amb 50 mM DTE. Tot el procés es duu a terme en fred.
2. Els homogenats es centrifuguen a 600 g durant 10 minuts a 4°C. Es recull el sobrenedant.
3. Les mostres es guarden a -80°C fins a l'anàlisi.
4. L'anàlisi dels nucleòtids es va realitzar injectant 80 µl mostra en una columna d'intercanvi iònic ODS Hipersil ( $\text{C}_{18}$ ) i aplicant un gradient lineal de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM: 75 mM acetat sòdic, pH 4,6 (tampó A) i 70% tampó A en metanol (tampó B). El gradient es va realitzar de 0% a 100% de tampó B, desenvolupant-se durant un període de 20 minuts a un flux de 1,5 ml/min.

---

## MODELS ANIMALS I EXPERIMENTS IN VIVO

---

### Models animals

En tots els experiments amb animals, aquests han estat adquirits de Harlan Interfarma IBERICA. Els animals han estat mantinguts a les instal·lacions de l'estabulari del Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona. Els ratolins han estat estabulats seguint un cicle de 12 hores de llum-fosc a una temperatura constant de 22°C i alimentats amb una dieta estàndard murina (Harlan Global Diet 2014), amb accés lliure al menjar i l'aigua excepte que protocol experimental requerís dejuni. En tal cas, el pinso era retirat, deixant lliure accés a l'aigua. Tots els protocols aplicats han estat prèviament aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona (C.E.E.A.).

Els animals utilitzats en els estudis realitzats són:

- Mus musculus, soca ICR (CD1): mascles d'edat compresa entre 4 i 5 setmanes.
- Mus musculus, soca mutant C57BKS.Cg-+Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup>OlaHsd (db/db): mascles d'edat compresa entre 6 i 8 setmanes.

### **Model de diabetis tipus I: inducció de diabetis experimental mitjançant estreptozotocina**

L'estreptozotocina (STZ) és una molècula constituïda per N-metil-N-nitrosurea unida al C-2 de la D-glucosa. És un tòxic que actua majoritàriament sobre la cèl·lula beta pancreàtica productora d'insulina, la qual destrueix. Per a la inducció de la diabetis experimental, ratolins de la soca ICR (CD1) d'entre 22 i 25 g de pes van ser administrats, alimentats ad libitum, amb una única injecció intraperitoneal de STZ a una dosi de 200 mg/Kg de pes corporal. Aquests ratolins els anomenarem ICR(CD1)STZ+. La STZ es dissol en una solució de tampó cítric:citrat sòdic 100 mM pH 4.5, immediatament abans de la seva administració, ja que és extremadament làbil (es degrada en 15-20 minuts un cop resuspesa en el tampó). Un cop realitzada la injecció, els animals es deixen en les condicions de manteniment estàndard. Una setmana després, es verifica la inducció de la diabetis mesurant la glucèmia després de 6 hores de dejú (començant entre les 8 i les 9 del matí). Només es van considerar diabètics, i inclosos a l'estudi, aquells ratolins que presenten glucèmies  $\geq 400$ mg/dl en dejú.

### **Model de diabetis tipus II: ratolí db/db**

Els ratolins mutants de la soca C57BKS.Cg-+Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup> OlaHsd (db/db) contenen una mutació espontània recessiva al receptor de la leptina (Lepr<sup>db</sup>). Els homozigots desenvolupen polifàgia, polidípsia i poliúria i obesitat a partir de les tres o quatre setmanes de vida. A més, manifesten hiperinsulinèmia a partir de les dues setmanes de vida i hiperglucèmia, resistència a la insulina i intolerància a la glucosa a partir de la quarta setmana de vida. Per aquestes raons és un model profusament emprat com a model de diabetis tipus II.

### **Transferència gènica hidrodinàmica**

La tècnica d'injecció hidrodinàmica és un mètode físic que aconsegueix una transferència gènica preferentment al fetge amb una eficiència de fins al 40% tal i com prèviament ha estat descrit (209; 210). La injecció hidrodinàmica s'ha realitzat, bàsicament, seguint el procediment descrit per Liu et al. (209), tal i com es detalla a continuació:

1. Per a una eficiència òptima és recomanable injectar animals d'entre 20 i 23 g de pes. Els micrògrams desitjats de vector plasmídic es resuspenen en un volum del 10% (grams de pes del ratolí/ml) de salí fisiològic apirògen (Grifols) o PBS 1X estèril (GIBCO) en una xeringa de 2 ml. És extremadament important utilitzar un DNA d'alta puresa i lliure d'endotoxines, per a evitar al màxim la necrosi hepàtica deguda a LPS.
2. Immobilitzar l'animal per a facilitar la injecció. No cal anestesiari l'animal. Per a dilatar les venes i facilitar la injecció, es submergeix la cua del ratolí en aigua atemperada (40-45°C) durant uns segons.
3. Es realitza la injecció de la totalitat de la solució salina que conté el plasmidi en una de les venes caudals laterals emprant una agulla 27G (BD Microfine™). És extremadament important que la injecció de la solució salina sigui feta de forma ininterrompuda i en un període de menys de 10 segons (normalment, uns set segons), per a una eficiència òptima de transfecció del fetge.

### **Administració dels adenovirus**

En infeccions sistèmiques, els adenovirus recombinants del serotip 5 són especialment eficients infectant el fetge (197). Per tant, per a obtenir una òptima eficiència de transducció dels vectors



d'expressió de shRNA al fetge, es van empaquetar les construccions en adenovirus del serotip 5, tal i com es descriu als paràgrafs anteriors. Els adenovirus es van administrar als ratolins de la soca db/db, d'edat compresa entre 6 i 8 setmanes, seguint les següents indicacions:

1. Es pesen els animals. Es calcula els  $\mu\text{l}$  de l'estoc viral que es necessitarà. Es van realitzar injeccions a una dosi intermèdia (aproximadament  $2.5 \cdot 10^9$  p.f.u.) i alta (aproximadament  $5 \cdot 10^9$  p.f.u.).
2. Es recuperen els adenovirus recombinants de  $-80^{\circ}\text{C}$  i es deixen descongelar en gel. És important evitar els cicles de congelació-descongelació. Per tant, descongelarem només les alíquotes necessàries.
3. Els adenovirus es resuspenen en un volum final de 200  $\mu\text{l}$  de salí fisiològic o PBS 1X estèril (GIBCO).
4. Es realitza la injecció en una de les venes caudals laterals emprant una agulla 27G (BD Microfine™). Per a facilitar la injecció, prèviament es submergeix la cua del ratolí en aigua atemperada ( $40-45^{\circ}\text{C}$ ) durant uns segons.

### **Administració de galactosamina-LPS**

Com a control positiu d'inducció d'apoptosi hepàtica, els ratolins ICR(CD1) van ser injectats intraperitonealment amb 200  $\mu\text{l}$  d'una solució de salí fisiològic apirògen (Grifols) contenint 700 mg/kg galactosamina (Sigma) i 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  lipopolisacàrid provinent d'E.coli (Sigma). La combinació galactosamina-LPS s'ha demostrat altament hepatotòxica (261). Els controls negatius van rebre la injecció equivalent de salí. Passades 6 hores, els ratolins van ser sacrificats, se'ls va extreure sang de la vena cava inferior per mesurar les transaminases sèriques (GPT) i se'ls va extreure el fetge per a assajar l'activitat caspasa 3.

### **Administració d'àcid 3-mercaptopicolínic**

Com a control positiu de la inhibició sistèmica de l'activitat PEPCK-C es va utilitzar l'àcid 3-mercaptopicolínic (3-MPA, Toronto Research Chemicals), conegut inhibidor competitiu de l'enzim (200). Els ratolins ICR (CD1) diabètics es van dejunar durant 2 hores abans de rebre una primera injecció intraperitoneal de 3-MPA 100 mg/kg resuspès en una solució salina de midó 1%. Es van mantenir en dejú. Passades tres hores, se'ls va administrar una segona dosi de 25 mg/kg de 3-MPA

preparat en la mateixa solució. Es van mantenir en dejú. Cinc hores després de la última injecció es va analitzar la glucèmia.

### **Mesura de la glucèmia**

La glucèmia dels ratolins es controlà regularment durant el període experimental en un glucòmetre Glucocard Memory 2 (Menarini). S'extreu una gota de sang de l'extrem de la cua mitjançant una petita incisió i s'aplica a una tira reactiva, que retorna en pocs segons el valor de la glucèmia.

### **Administració de metformina**

Els ratolins db/db es van tractar amb una dosi 400 mg/kg de metformina, administrada a través de l'aigua de beguda. Per tal d'ajustar la dosi, es va controlar diàriament, durant la setmana prèvia al tractament, l'aigua consumida per gàbia i dia. A partir d'aquí es va fer una estimació del consum diari d'aigua per ratolí i dia. Tenint en compte això, es va preparar una solució de metformina en aigua de l'aixeta i es va dipositar als biberons de les gàbies, de manera que la dosi diària de metformina administrada fos de 400 mg/kg. Es va controlar el pes, la glucèmia en alimentació i el volum d'aigua consumit tres cops per setmana durant la durada de l'experiment.

### **Administració de poli dI:dC**

L'anàleg de RNA de doble cadena poli(desoxi-inosina:desoxi-citosina) (poli dI:dC, Amersham Pharmacia) es va administrar als ratolins ICR (CD1)STZ+ com a control positiu de activació de la via de PKR/Interferó per RNA. Una dosi de 50 µg poli dI:dC resuspesa en un volum final de 200 µl de salí fisiològic es injectar intraperitonealment als ratolins. Els ratolins control es van injectar amb 200 µl de salí fisiològic (Grifols). Passades 48 o 72 hores, es ratolins van ser sacrificats se'ls va extreure sang de la vena cava inferior per mesurar el contingut d'interleuquina 12 (IL12) i se'ls va extreure el fetge per a estimar l'ativació de eIF2 $\alpha$ .

### **Dejuni**

En els protocols experimentals que requerien dejuni, aquest s'inicià habitualment a partir de les 8 del matí, ja que tot just ha acabat el període de fosc, durant el qual els animals han estat menjant

lliurement. En els ratolins amb diabetis experimental induïda per STZ, es va aplicar un dejuni curt, de 6 hores, per a evitar hipoglucèmies, ja que, degut a la manca la absència d'insulina, aquests animals no tenen reservoris de glicogen. En els ratolins db/db, en canvi, per tal de deplecionar el glicogen hepàtic per a discernir els efectes de la producció hepàtica de glucosa originària de gluconeogènesi, els dejunis aplicats eren llargs, habitualment de 18 a 32 hores, segons el protocol a realitzar.

### **Test de tolerància intraperitoneal a la glucosa**

Aquest test s'utilitza amb la finalitat d'analitzar la capacitat de captació i metabolització de la glucosa. En resposta a un bolus de glucosa, un animal sa és capaç de tornar als nivells basals de glucosa circulants en dues hores. En canvi, un animal diabètic encara presenta nivells elevats de glucèmia passat aquest temps. Aquest assaig es realitzà, o bé 48 hores després de la injecció hidrodinàmica dels plasmidis d'expressió de shRNA en ratolins ICR(CD1)STZ+, o bé 7 dies després de la infecció de ratolins db/db amb els adenovirus recombinants. El procediment seguit és el següent:

1. Els animals han d'estar en dejú per a evitar interferències degudes a glicogenòlisi.
2. Es fa una lectura prèvia dels nivells de glucosa circulants.
3. Es fa una injecció intraperitoneal de 1g/kg (en els ratolins ICR(CD1) STZ+) o de 2g/kg (en els ratolins db/db) dissolta en salí fisiològic.
4. A partir d'aquest moment es fan extraccions de sang seriades amb un interval de 30 minuts fins a les 2 hores. En cada punt s'extreu una gota de sang de la vena de la cua i es mesura la concentració de glucosa en sang.

### **Test de tolerància intraperitoneal a la insulina**

Aquest test indica la capacitat que tenen els teixits sensibles a insulina de captar glucosa en resposta a un bolus d'insulina. En un animal sa, en resposta al bolus d'insulina, els nivells de glucosa disminüïren més ostensiblement que en un de diabètic. El procediment seguit és el següent:

1. Els animals (ratolins db/db en aquest cas) estaven en alimentació.
2. Es fa una lectura prèvia dels nivells de glucosa circulants.
3. Es fa una injecció intraperitoneal de 10 U/kg d'insulina de pàncreas boví (Sigma) en salí fisiològic.

4. A partir d'aquest moment es fan extraccions de sang seriades amb un interval de 30 minuts fins a les 2 hores. En cada punt s'extreu una gota de sang de la vena de la cua i es mesura la concentració de glucosa en sang.

### **Test de sensibilitat perifèrica a la insulina**

Aquest assaig permet estimar la capacitat d'activació de la via de la insulina en resposta a un bolus de la hormona. Es va realitzar en ratolins db/db dejunats durant 32 hores, 7 dies després de la infecció amb els adenovirus recombinants seguint el següent protocol:

1. Els animals són sotmesos a dejuni durant 24 hores, per a disminuir l'activitat de la via d'insulina a nivells basals.
2. S'anestesia el ratolí amb isofluorane:buprenorfina i s'extreu un a mostra de teixit adipós epididimal, de múscul (Soleus i Gastrocnemius) d'una de les extremitats posteriors i de fetge (lòbul 1) es congela ràpidament en N<sub>2</sub> líquid.
3. S'injecta a través de la vena de la cua una dosi de 10 U/kg d'insulina de pàncreas boví (Sigma) en salí fisiològic.
4. Cinc minuts després s'extreu una altra peça de teixit adipós epididimal, múscul (Soleus i Gastrocnemius) de l'altra extremitat posterior i fetge (lòbul 1). Els teixits es van conservar a -80°C fins a l'anàlisi.
5. A la finalització de l'experiment, els ratolins són sacrificats per dislocació cervical.

### **Test de producció de glucosa a partir de piruvat**

Aquest assaig consisteix en la injecció d'un bolus de piruvat en els animals dejunats i permet fer una estimació de la capacitat gluconeogènica. Es va realitzar en ratolins db/db dejunats durant 32 hores 7 dies després de la infecció amb els adenovirus recombinants seguint el següent protocol:

1. Els animals són sotmesos a dejuni durant 32 hores, per a estimular la gluconeogènesi hepàtica.
2. Es fa una lectura prèvia dels nivells de glucosa circulants.
3. Es fa una injecció intraperitoneal de 2g/kg de piruvat (Sigma) en PBS 1X estèril (GIBCO).
4. A partir d'aquest moment es fan extraccions de sang seriades, amb un interval de 30 min, fins a les 2 hores. En cada punt s'extreu una gota de sang de la vena de la cua i es mesura la concentració de glucosa en sang.

### Gàbies metabòliques

Per a analitzar les funcions fisiològiques bàsiques (ingesta, orina, defecació), els ratolins db/db, set dies després de la infecció amb els adenovirus recombinants, van ser estabulats individualment en gàbies metabòliques amb lliure accés a la beguda i el menjar, durant un període de 24 hores. Passat aquest període, els ratolins van ser tornats a les seves gàbies. Es va quantificar el pinso ingerit, l'H<sub>2</sub>O beguda, l'orina i la femta excretades.

### Anestèsia, eutanàsia i presa de mostres

Per a l'anestèsia dels ratolins ICR (CD1) es fa servir una combinació d'anestèsic (ketamina) i analgèsic (xilacina) administrada intraperitonealment. Els ratolins de la soca db/db, degut al seu alt contingut corporal de greixos, l'administració intraperitoneal d'un anestèsic liposoluble de metabolització hepàtica, com és la ketamina, no resulta una metodologia adequada, ja que el fàrmac queda retingut en els seus dipòsits de greix, dificultant l'anestèsia. Per aquesta raó, en aquest model animal d'obesitat i diabetis es va optar per l'anestèsia amb isofluorane, un anestèsic que s'administra inhalat, complementat amb l'analgèsic buprenorfina. Les dosis administrades dels anestèsics i analgèsics es recullen a la següent taula:

Principi actiu	Nom comercial	Proveïdor	Dosi
Ketamina	Imalgène 1000	Merial Laboratorio	150 mg/kg
Xilazina	Xilagesic 2%	Laboratorios Calier	3 mg/kg
Isofluorane	Forane	Abbot	Inducció: a demanda Manteniment: flux 2 %
Buprenorfina	Buprex 0.3mg/ml	Schering Plough	0.3 mg/kg

En el punt final dels experiments, l'animal és sacrificat per intoxicació amb CO<sub>2</sub> o bé anestesiats amb Ketamina-Xilazina, o isofluorane-buprenorfina. Seguidament, es realitza una laparotomia i es procedeix a la recollida de mostres.

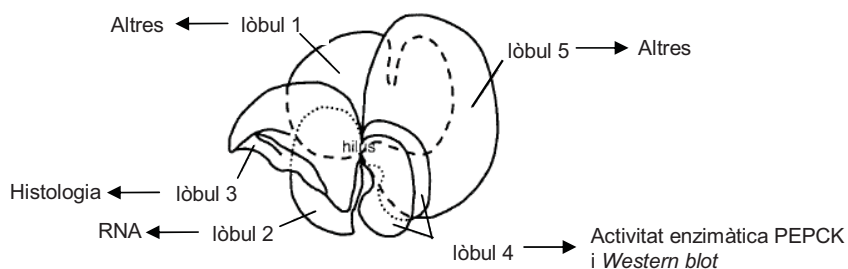
### Obtenció del sèrum de ratolí

L'extracció de sang es fa per punció cardíaca o bé a través de la vena cava inferior en el moment de la necròpsia. El sèrum s'obté després de deixar coagular la sang durant 60 min a temperatura

ambient. El coàgul es separa mitjançant centrifugació a 2500 rpm a 4° C durant 15 minuts. El sèrum es manté congelat a -80° C fins al moment de la determinació dels diferents paràmetres.

### **Obtenció de teixits**

Durant la necròpsia es va recollir: fetge, ronyó, teixit adipós, pàncreas, melsa, múscul (Soleus i Gastrocnemius). Els teixits un cop extrets, eren cogelats ràpidament en N<sub>2</sub> líquid i conservats a -80°C fins al seu anàlisi. En el cas del fetge les mostres per als diferents assajos, es prenen de forma sistemàtica del mateix lòbul (Figura 80).



**Figura 80. Presa de mostres del fetge i anàlisi realitzats.**

---

## **BIBLIOGRAFIA**

---





1. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J: Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787, 2001
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H: Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053, 2004
3. Collins QF, Xiong Y, Lupo EG, Jr., Liu HY, Cao W: p38 Mitogen-activated protein kinase mediates free fatty acid-induced gluconeogenesis in hepatocytes. *J Biol Chem* 281:24336-24344, 2006
4. Kahn BB: Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* 92:593-596, 1998
5. Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR: Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* 88:561-572, 1997
6. Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, Accili D: Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* 105:199-205, 2000
7. Kulkarni RN, Almind K, Goren HJ, Winnay JN, Ueki K, Okada T, Kahn CR: Impact of genetic background on development of hyperinsulinemia and diabetes in insulin receptor/insulin receptor substrate-1 double heterozygous mice. *Diabetes* 52:1528-1534, 2003
8. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB: Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-733, 2001
9. Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR: A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2:559-569, 1998
10. Lauro D, Kido Y, Castle AL, Zarnowski MJ, Hayashi H, Ebina Y, Accili D: Impaired glucose tolerance in mice with a targeted impairment of insulin action in muscle and adipose tissue. *Nat Genet* 20:294-298, 1998
11. Kim JK, Michael MD, Previs SF, Peroni OD, Mauvais-Jarvis F, Neschen S, Kahn BB, Kahn CR, Shulman GI: Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest* 105:1791-1797, 2000
12. Nakae J, Kido Y, Accili D: Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev* 22:818-835, 2001
13. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR: Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6:87-97, 2000

14. Puigserver P, Rodgers JT: Foxa2, a novel transcriptional regulator of insulin sensitivity. *Nat Med* 12:38-39, 2006
  
15. Wolfrum C, Stoffel M: Coactivation of Foxa2 through Pgc-1beta promotes liver fatty acid oxidation and triglyceride/VLDL secretion. *Cell Metab* 3:99-110, 2006
  
16. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL: Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 6:77-86, 2000
  
17. Dentin R, Pegorier JP, Benhamed F, Fougelle F, Ferre P, Fauveau V, Magnuson MA, Girard J, Postic C: Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 279:20314-20326, 2004
  
18. Cha JY, Repa JJ: The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 282:743-751, 2007
  
19. Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS: Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11245-11250, 2004
  
20. Drynan L, Quant PA, Zammit VA: The role of changes in the sensitivity of hepatic mitochondrial overt carnitine palmitoyltransferase in determining the onset of the ketosis of starvation in the rat. *Biochem J* 318 ( Pt 3):767-770, 1996
  
21. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA: The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785-789, 1963
  
22. Shulman GI: Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:171-176, 2000
  
23. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI: Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48:1270-1274, 1999
  
24. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI: Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 279:32345-32353, 2004
  
25. Samuel VT, Liu ZX, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, Zhang XM, Monia BP, Bhanot S, Shulman GI: Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 117:739-745, 2007
  
26. Choi CS, Savage DB, Kulkarni A, Yu XX, Liu ZX, Morino K, Kim S, Distefano A, Samuel VT, Neschen S, Zhang D, Wang A, Zhang XM, Kahn M, Cline GW, Pandey SK, Geisler JG, Bhanot S, Monia BP, Shulman GI: Suppression of Diacylglycerol Acyltransferase-2 (DGAT2), but Not DGAT1, with Antisense

Oligonucleotides Reverses Diet-induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *J Biol Chem* 282:22678-22688, 2007

27. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM: Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 7:45-56, 2008

28. McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW: A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest* 60:265-270, 1977

29. Saha AK, Ruderman NB: Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership. *Mol Cell Biochem* 253:65-70, 2003

30. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, Wakil SJ: Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* 291:2613-2616, 2001

31. Abu-Elheiga L, Oh W, Kordari P, Wakil SJ: Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10207-10212, 2003

32. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW: AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol* 574:7-15, 2006

33. Foretz M, Ancellin N, Andreelli F, Saintillan Y, Grondin P, Kahn A, Thorens B, Vaulont S, Viollet B: Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes* 54:1331-1339, 2005

34. Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K: Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277:3829-3835, 2002

35. Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, Hue L, Andreelli F: Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol* 574:41-53, 2006

36. Towler MC, Hardie DG: AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 100:328-341, 2007

37. DeFronzo RA: Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 131:281-303, 1999

38. Simonson DC, Ferrannini E, Bevilacqua S, Smith D, Barrett E, Carlson R, DeFronzo RA: Mechanism of improvement in glucose metabolism after chronic glyburide therapy. *Diabetes* 33:838-845, 1984

39. Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR: Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Jama* 281:2005-2012, 1999
40. Kahn CR, Chen L, Cohen SE: Unraveling the mechanism of action of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 106:1305-1307, 2000
41. Goldstein BJ: Rosiglitazone. *Int J Clin Pract* 54:333-337, 2000
42. Schoonjans K, Auwerx J: Thiazolidinediones: an update. *Lancet* 355:1008-1010, 2000
43. Hanson RW, Reshef L: Glyceroneogenesis revisited. *Biochimie* 85:1199-1205, 2003
44. Beale EG, Hammer RE, Antoine B, Forest C: Dysregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene. *Trends Endocrinol Metab* 15:129-135, 2004
45. Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R, Auwerx J: Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med* 4:1053-1057, 1998
46. Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM: Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med* 4:1046-1052, 1998
47. Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JG, Ming UT, Baird SM, Thomazy VA, Evans RM: Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat Med* 4:1058-1061, 1998
48. Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhausl W, Fornsinn C: Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes* 53:1052-1059, 2004
49. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC: The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310:1642-1646, 2005
50. Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WGt, Schlattner U, Neumann D, Brownlee M, Freeman MB, Goldman MH: Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 279:43940-43951, 2004
51. Bailey CJ: Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care* 15:755-772, 1992
52. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI: Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 49:2063-2069, 2000

53. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE: Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108:1167-1174, 2001
54. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR: Metformin: an update. *Ann Intern Med* 137:25-33, 2002
55. Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE: Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 333:550-554, 1995
56. Buettner C, Patel R, Muse ED, Bhanot S, Monia BP, McKay R, Obici S, Rossetti L: Severe impairment in liver insulin signaling fails to alter hepatic insulin action in conscious mice. *J Clin Invest* 115:1306-1313, 2005
57. Okamoto H, Obici S, Accili D, Rossetti L: Restoration of liver insulin signaling in *Insr* knockout mice fails to normalize hepatic insulin action. *J Clin Invest* 115:1314-1322, 2005
58. Lam TK, Poci A, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Schwartz GJ, Rossetti L: Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat Med* 11:320-327, 2005
59. Poci A, Obici S, Schwartz GJ, Rossetti L: A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metab* 1:53-61, 2005
60. Poci A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Rossetti L: Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 434:1026-1031, 2005
61. Bernal-Mizrachi C, Xiaozhong L, Yin L, Knutsen RH, Howard MJ, Arends JJ, Desantis P, Coleman T, Semenkovich CF: An afferent vagal nerve pathway links hepatic PPARalpha activation to glucocorticoid-induced insulin resistance and hypertension. *Cell Metab* 5:91-102, 2007
62. Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Iwasaki H, Ishihara H, Sasano H, Inukai K, Mizuguchi H, Asano T, Shiota M, Nakazato M, Oka Y: Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science* 312:1656-1659, 2006
63. Jungermann K, Kietzmann T: Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* 16:179-203, 1996
64. Jungermann K, Kietzmann T: Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int* 51:402-412, 1997
65. Rosella G, Zajac JD, Kaczmarczyk SJ, Andrikopoulos S, Proietto J: Impaired suppression of gluconeogenesis induced by overexpression of a noninsulin-responsive phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Endocrinol* 7:1456-1462, 1993

66. Nordlie RC, Lardy HA: Mammalian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. *J Biol Chem* 238:2259-2263, 1963
67. Utter MF, Kurahashi K: Purification of oxalacetic carboxylase from chicken liver. *J Biol Chem* 207:787-802, 1954
68. Wiese TJ, Lambeth DO, Ray PD: The intracellular distribution and activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase isozymes in various tissues of several mammals and birds. *Comp Biochem Physiol B* 100:297-302, 1991
69. Chakravarty K, Leahy P, Becard D, Hakimi P, Foretz M, Ferre P, Foufelle F, Hanson RW: Sterol regulatory element-binding protein-1c mimics the negative effect of insulin on phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription. *J Biol Chem* 276:34816-34823, 2001
70. Hanson RW, Reshef L: Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* 66:581-611, 1997
71. Dhakras PS, Hajarnis S, Taylor L, Curthoys NP: cAMP-dependent stabilization of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in LLC-PK1-F+ kidney cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F313-318, 2006
72. Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, Spiegelman BM: Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4012-4017, 2003
73. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM: Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413:131-138, 2001
74. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM: Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423:550-555, 2003
75. Barthel A, Schmol D, Kruger KD, Bahrenberg G, Walther R, Roth RA, Joost HG: Differential regulation of endogenous glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by the forkhead transcription factor FKHR in H4IIE-hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285:897-902, 2001
76. Biggs WH, 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC: Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7421-7426, 1999
77. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A: Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11285-11290, 2003

78. Schmol D, Walker KS, Alessi DR, Grempler R, Burchell A, Guo S, Walther R, Unterman TG: Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J Biol Chem* 275:36324-36333, 2000
79. Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D: The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest* 108:1359-1367, 2001
80. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P: Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434:113-118, 2005
81. Frescas D, Valenti L, Accili D: Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem* 280:20589-20595, 2005
82. Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, Nakajima T, Fukamizu A: Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10042-10047, 2004
83. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A: Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11278-11283, 2005
84. Qiao L, MacDougald OA, Shao J: CCAAT/enhancer-binding protein alpha mediates induction of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 281:24390-24397, 2006
85. Yanez AJ, Nualart F, Droppelmann C, Bertinat R, Brito M, Concha, II, Slebe JC: Broad expression of fructose-1,6-bisphosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase provide evidence for gluconeogenesis in human tissues other than liver and kidney. *J Cell Physiol* 197:189-197, 2003
86. Kalhan SC, Mahajan S, Burkett E, Reshef L, Hanson RW: Glyceroneogenesis and the source of glycerol for hepatic triacylglycerol synthesis in humans. *J Biol Chem* 276:12928-12931, 2001
87. Olswang Y, Cohen H, Papo O, Cassuto H, Croniger CM, Hakimi P, Tilghman SM, Hanson RW, Reshef L: A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:625-630, 2002
88. Franckhauser S, Munoz S, Pujol A, Casellas A, Riu E, Otaegui P, Su B, Bosch F: Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes* 51:624-630, 2002
89. Franckhauser S, Munoz S, Elias I, Ferre T, Bosch F: Adipose overexpression of phosphoenolpyruvate carboxykinase leads to high susceptibility to diet-induced insulin resistance and obesity. *Diabetes* 55:273-280, 2006

90. Olswang Y, Blum B, Cassuto H, Cohen H, Biberman Y, Hanson RW, Reshef L: Glucocorticoids repress transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene in adipocytes by inhibiting its C/EBP-mediated activation. *J Biol Chem* 278:12929-12936, 2003
91. Millward CA, Heaney JD, Sinasac DS, Chu EC, Bederman IR, Gilge DA, Previs SF, Croniger CM: Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein beta are protected against diet-induced obesity. *Diabetes* 56:161-167, 2007
92. Schroeder-Gloeckler JM, Rahman SM, Janssen RC, Qiao L, Shao J, Roper M, Fischer SJ, Lowe E, Orlicky DJ, McManaman JL, Palmer C, Gitomer WL, Huang W, O'Doherty R M, Becker TC, Klemm DJ, Jensen DR, Pulawa LK, Eckel RH, Friedman JE: CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) deletion reduces adiposity, hepatic steatosis, and diabetes in Leprdb/db mice. *J Biol Chem*, 2007
93. Hakimi P, Johnson MT, Yang J, Lepage DF, Conlon RA, Kalhan SC, Reshef L, Tilghman SM, Hanson RW: Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the critical role of cataplerosis in the control of hepatic metabolism. *Nutr Metab (Lond)* 2:33, 2005
94. Burgess SC, He T, Yan Z, Lindner J, Sherry AD, Malloy CR, Browning JD, Magnuson MA: Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver. *Cell Metab* 5:313-320, 2007
95. She P, Shiota M, Shelton KD, Chalkley R, Postic C, Magnuson MA: Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Mol Cell Biol* 20:6508-6517, 2000
96. She P, Burgess SC, Shiota M, Flakoll P, Donahue EP, Malloy CR, Sherry AD, Magnuson MA: Mechanisms by which liver-specific PEPCK knockout mice preserve euglycemia during starvation. *Diabetes* 52:1649-1654, 2003
97. Burgess SC, Hausler N, Merritt M, Jeffrey FM, Storey C, Milde A, Koshy S, Lindner J, Magnuson MA, Malloy CR, Sherry AD: Impaired tricarboxylic Acid cycle activity in mouse livers lacking cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem* 279:48941-48949, 2004
98. Hakimi P, Yang J, Casadesus G, Massillon D, Tolentino-Silva F, Nye CK, Cabrera ME, Hagen DR, Utter CB, Baghdy Y, Johnson DH, Wilson DL, Kirwan JP, Kalhan SC, Hanson RW: Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse. *J Biol Chem* 282:32844-32855, 2007
99. Magnusson I, Rothman DL, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI: Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest* 90:1323-1327, 1992
100. Consoli A, Nurjhan N, Capani F, Gerich J: Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes* 38:550-557, 1989



101. Valera A, Pujol A, Pelegrin M, Bosch F: Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9151-9154, 1994
102. Sun Y, Liu S, Ferguson S, Wang L, Klepcyk P, Yun JS, Friedman JE: Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *J Biol Chem* 277:23301-23307, 2002
103. Cao H, van der Veer E, Ban MR, Hanley AJ, Zinman B, Harris SB, Young TK, Pickering JG, Hegele RA: Promoter polymorphism in PCK1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase gene) associated with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 89:898-903, 2004
104. Shin HD, Park BL, Kim LH, Cheong HS, Kim JH, Cho YM, Lee HK, Park KS: Association of a polymorphism in the gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 with high-density lipoprotein and triglyceride levels. *Diabetologia* 48:2025-2032, 2005
105. Shapiro AM, Lakey JR: Future trends in islet cell transplantation. *Diabetes Technol Ther* 2:449-452, 2000
106. Trucco M: Regeneration of the pancreatic beta cell. *J Clin Invest* 115:5-12, 2005
107. Levine F, Leibowitz G: Towards gene therapy of diabetes mellitus. *Mol Med Today* 5:165-171, 1999
108. Riu E, Mas A, Ferre T, Pujol A, Gros L, Otaegui P, Montoliu L, Bosch F: Counteraction of type 1 diabetic alterations by engineering skeletal muscle to produce insulin: insights from transgenic mice. *Diabetes* 51:704-711, 2002
109. Jimenez-Chillaron JC, Newgard CB, Gomez-Foix AM: Increased glucose disposal induced by adenovirus-mediated transfer of glucokinase to skeletal muscle in vivo. *Faseb J* 13:2153-2160, 1999
110. Otaegui PJ, Ferre T, Pujol A, Riu E, Jimenez R, Bosch F: Expression of glucokinase in skeletal muscle: a new approach to counteract diabetic hyperglycemia. *Hum Gene Ther* 11:1543-1552, 2000
111. Jimenez-Chillaron JC, Telemaque-Potts S, Gomez-Valades AG, Anderson P, Newgard CB, Gomez-Foix AM: Glucokinase gene transfer to skeletal muscle of diabetic Zucker fatty rats improves insulin-sensitive glucose uptake. *Metabolism* 51:121-126, 2002
112. Otaegui PJ, Ferre T, Riu E, Bosch F: Prevention of obesity and insulin resistance by glucokinase expression in skeletal muscle of transgenic mice. *Faseb J* 17:2097-2099, 2003
113. Mas A, Montane J, Anguela XM, Munoz S, Douar AM, Riu E, Otaegui P, Bosch F: Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle. *Diabetes* 55:1546-1553, 2006

114. Ferre T, Pujol A, Riu E, Bosch F, Valera A: Correction of diabetic alterations by glucokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7225-7230, 1996
115. Desai UJ, Slosberg ED, Boettcher BR, Caplan SL, Fanelli B, Stephan Z, Gunther VJ, Kaleko M, Connelly S: Phenotypic correction of diabetic mice by adenovirus-mediated glucokinase expression. *Diabetes* 50:2287-2295, 2001
116. Ferre T, Riu E, Franckhauser S, Agudo J, Bosch F: Long-term overexpression of glucokinase in the liver of transgenic mice leads to insulin resistance. *Diabetologia* 46:1662-1668, 2003
117. O'Doherty RM, Lehman DL, Telemaque-Potts S, Newgard CB: Metabolic impact of glucokinase overexpression in liver: lowering of blood glucose in fed rats is accompanied by hyperlipidemia. *Diabetes* 48:2022-2027, 1999
118. Altomonte J, Richter A, Harbaran S, Suriawinata J, Nakae J, Thung SN, Meseck M, Accili D, Dong H: Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E718-728, 2003
119. Qu S, Altomonte J, Perdomo G, He J, Fan Y, Kamagate A, Meseck M, Dong HH: Aberrant Forkhead box O1 function is associated with impaired hepatic metabolism. *Endocrinology* 147:5641-5652, 2006
120. Samuel VT, Choi CS, Phillips TG, Romanelli AJ, Geisler JG, Bhanot S, McKay R, Monia B, Shutter JR, Lindberg RA, Shulman GI, Veniant MM: Targeting foxo1 in mice using antisense oligonucleotide improves hepatic and peripheral insulin action. *Diabetes* 55:2042-2050, 2006
121. Seely BL, Staubs PA, Reichart DR, Berhanu P, Milarski KL, Saltiel AR, Kusari J, Olefsky JM: Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes* 45:1379-1385, 1996
122. Kennedy BP, Ramachandran C: Protein tyrosine phosphatase-1B in diabetes. *Biochem Pharmacol* 60:877-883, 2000
123. Kenner KA, Anyanwu E, Olefsky JM, Kusari J: Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling. *J Biol Chem* 271:19810-19816, 1996
124. Zinker BA, Rondinone CM, Trevillyan JM, Gum RJ, Clampit JE, Waring JF, Xie N, Wilcox D, Jacobson P, Frost L, Kroeger PE, Reilly RM, Koterski S, Opgenorth TJ, Ulrich RG, Crosby S, Butler M, Murray SF, McKay RA, Bhanot S, Monia BP, Jirousek MR: PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11357-11362, 2002
125. Liu G: Technology evaluation: ISIS-113715, Isis. *Curr Opin Mol Ther* 6:331-336, 2004

126. Koizumi M, Takagi-Sato M, Okuyama R, Araki K, Sun W, Nakai D, Tsutsumi S, Kawai K: Direct comparison of in vivo antisense activity of ENA oligonucleotides targeting PTP1B mRNA with that of 2'-O-(2-methoxy)ethyl-modified oligonucleotides. *Oligonucleotides* 16:253-262, 2006
127. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Kordari P, Oh W, Shaikenov T, Gu Z, Wakil SJ: Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12011-12016, 2005
128. Oh W, Abu-Elheiga L, Kordari P, Gu Z, Shaikenov T, Chirala SS, Wakil SJ: Glucose and fat metabolism in adipose tissue of acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1384-1389, 2005
129. Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, Finegold M, Wakil SJ: Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6358-6363, 2003
130. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ: The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1444-1449, 2000
131. Harada N, Oda Z, Hara Y, Fujinami K, Okawa M, Ohbuchi K, Yonemoto M, Ikeda Y, Ohwaki K, Aragane K, Tamai Y, Kusunoki J: Hepatic de novo lipogenesis is present in liver-specific ACC1 deficient mice. *Mol Cell Biol*, 2007
132. Savage DB, Choi CS, Samuel VT, Liu ZX, Zhang D, Wang A, Zhang XM, Cline GW, Yu XX, Geisler JG, Bhanot S, Monia BP, Shulman GI: Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest* 116:817-824, 2006
133. Burger HJ, Schubert G, Hemmerle H, Kramer W, Herling AW: Pharmacological interference with hepatic glucose production. *Ann N Y Acad Sci* 892:312-314, 1999
134. Lei KJ, Shelly LL, Pan CJ, Sidbury JB, Chou JY: Mutations in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type 1a. *Science* 262:580-583, 1993
135. van Dijk TH, van der Sluijs FH, Wiegman CH, Baller JF, Gustafson LA, Burger HJ, Herling AW, Kuipers F, Meijer AJ, Reijngoud DJ: Acute inhibition of hepatic glucose-6-phosphatase does not affect gluconeogenesis but directs gluconeogenic flux toward glycogen in fasted rats. A pharmacological study with the chlorogenic acid derivative S4048. *J Biol Chem* 276:25727-25735, 2001
136. Huang A, Chen Y, Wang X, Zhao S, Su N, White DW: Functional silencing of hepatic microsomal glucose-6-phosphatase gene expression in vivo by adenovirus-mediated delivery of short hairpin RNA. *FEBS Lett* 558:69-73, 2004
137. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Fougelle F, Dyck JR, Girard J, Postic C: Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 55:2159-2170, 2006

138. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811, 1998
139. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP: RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25-33, 2000
140. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200, 2001
141. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T: Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110:563-574, 2002
142. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ: Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305:1437-1441, 2004
143. Haley B, Zamore PD: Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* 11:599-606, 2004
144. Amarzguioui M, Holen T, Babaie E, Prydz H: Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res* 31:589-595, 2003
145. Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297, 2004
146. Krutzfeldt J, Stoffel M: MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab* 4:9-12, 2006
147. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS: Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16:948-958, 2002
148. Tuschl T: Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* 20:446-448, 2002
149. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553, 2002
150. Paddison PJ, Caudy AA, Sachidanandam R, Hannon GJ: Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells. *Methods Mol Biol* 265:85-100, 2004
151. Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H: Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 30:1757-1766, 2002
152. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A: Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22:326-330, 2004

153. Shao Y, Chan CY, Maliyekkel A, Lawrence CE, Roninson IB, Ding Y: Effect of target secondary structure on RNAi efficiency. *Rna* 13:1631-1640, 2007
154. Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ: Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 23:222-226, 2005
155. Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, Hannon GJ, Cleary MA: Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* 23:227-231, 2005
156. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS: Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21:635-637, 2003
157. Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilesley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville S, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, Marshall WS, Khvorova A: 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 3:199-204, 2006
158. Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, Linsley PS: Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *Rna* 12:1179-1187, 2006
159. Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR: Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5:834-839, 2003
160. Bridge AJ, Pebernard S, Ducaux A, Nicoulaz AL, Iggo R: Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34:263-264, 2003
161. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougères A, Endres S, Hartmann G: Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11:263-270, 2005
162. Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I: Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23:457-462, 2005
163. Fedorov Y, Anderson EM, Birmingham A, Reynolds A, Karpilow J, Robinson K, Leake D, Marshall WS, Khvorova A: Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *Rna* 12:1188-1196, 2006
164. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA: Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441:537-541, 2006
165. Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, Johnson JM, Lim L, Karpilow J, Nichols K, Marshall W, Khvorova A, Linsley PS: Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *Rna* 12:1197-1205, 2006

166. Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I: Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther* 13:494-505, 2006
167. Mook OR, Baas F, de Wissel MB, Fluiter K: Evaluation of locked nucleic acid-modified small interfering RNA in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 6:833-843, 2007
168. Bramsen JB, Laursen MB, Damgaard CK, Lena SW, Babu BR, Wengel J, Kjems J: Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs. *Nucleic Acids Res* 35:5886-5897, 2007
169. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP: Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432:173-178, 2004
170. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Rohl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliansky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I: RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441:111-114, 2006
171. Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, Teratani T, Namatame N, Yamamoto Y, Hanai K, Kato T, Sano A, Ochiya T: Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12177-12182, 2005
172. Schiffelers RM, Ansari A, Xu J, Zhou Q, Tang Q, Storm G, Molema G, Lu PY, Scaria PV, Woodle MC: Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res* 32:e149, 2004
173. Akhtar S, Benter I: Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. *Adv Drug Deliv Rev* 59:164-182, 2007
174. Ishida T, Wang X, Shimizu T, Nawata K, Kiwada H: PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner. *J Control Release* 122:349-355, 2007
175. Semple SC, Harasym TO, Clow KA, Ansell SM, Klimuk SK, Hope MJ: Immunogenicity and rapid blood clearance of liposomes containing polyethylene glycol-lipid conjugates and nucleic Acid. *J Pharmacol Exp Ther* 312:1020-1026, 2005
176. Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J: Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 23:709-717, 2005

177. Peer D, Zhu P, Carman CV, Lieberman J, Shimaoka M: Selective gene silencing in activated leukocytes by targeting siRNAs to the integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4095-4100, 2007
178. Peer D, Park EJ, Morishita Y, Carman CV, Shimaoka M: Systemic leukocyte-directed siRNA delivery revealing cyclin D1 as an anti-inflammatory target. *Science* 319:627-630, 2008
179. Uprichard SL: The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Lett* 579:5996-6007, 2005
180. de Fougères A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J: Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6:443-453, 2007
181. Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, Hartsough K, Machemer L, Radka S, Jadhav V, Vaish N, Zinnen S, Vargeese C, Bowman K, Shaffer CS, Jeffs LB, Judge A, MacLachlan I, Polisky B: Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 23:1002-1007, 2005
182. Geisbert TW, Hensley LE, Kagan E, Yu EZ, Geisbert JB, Daddario-DiCaprio K, Fritz EA, Jahrling PB, McClintock K, Phelps JR, Lee AC, Judge A, Jeffs LB, MacLachlan I: Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference. *J Infect Dis* 193:1650-1657, 2006
183. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J: RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9:347-351, 2003
184. McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA: Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 21:639-644, 2003
185. Zhang Y, Cristofaro P, Silbermann R, Pusch O, Boden D, Konkin T, Hovanesian V, Monfils PR, Resnick M, Moss SF, Ramratnam B: Engineering mucosal RNA interference in vivo. *Mol Ther* 14:336-342, 2006
186. Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DC, Wong LF, Bilisland LG, Greensmith L, Kingsman SM, Mitrophanous KA, Mazarakis ND, Azzouz M: Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11:429-433, 2005
187. Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, Paulson HL, Yang L, Kotin RM, Davidson BL: RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10:816-820, 2004
188. Harper SQ, Staber PD, He X, Eliason SL, Martins IH, Mao Q, Yang L, Kotin RM, Paulson HL, Davidson BL: RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5820-5825, 2005

189. Singer O, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Coufal NG, Gage FH, Verma IM, Masliah E: Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* 8:1343-1349, 2005
190. Makimura H, Mizuno TM, Mastaitis JW, Agami R, Mobbs CV: Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. *BMC Neurosci* 3:18, 2002
191. Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ: Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 65:8984-8992, 2005
192. Takei Y, Kadomatsu K, Yuzawa Y, Matsuo S, Muramatsu T: A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res* 64:3365-3370, 2004
193. Tolentino MJ, Brucker AJ, Fosnot J, Ying GS, Wu IH, Malik G, Wan S, Reich SJ: Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization. *Retina* 24:132-138, 2004
194. Shen J, Samul R, Silva RL, Akiyama H, Liu H, Saishin Y, Hackett SF, Zinnen S, Kossen K, Fosnaugh K, Vargeese C, Gomez A, Bouhana K, Aitchison R, Pavco P, Campochiaro PA: Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* 13:225-234, 2006
195. Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S: Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7797-7802, 2003
196. Lewis DL, Wolff JA: Delivery of siRNA and siRNA expression constructs to adult mammals by hydrodynamic intravascular injection. *Methods Enzymol* 392:336-350, 2005
197. Huard J, Lochmuller H, Acsadi G, Jani A, Massie B, Karpati G: The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther* 2:107-115, 1995
198. Desvergne B, Michalik L, Wahli W: Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* 86:465-514, 2006
199. Landau BR, Wahren J, Chandramouli V, Schumann WC, Ekberg K, Kalhan SC: Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J Clin Invest* 98:378-385, 1996
200. Jomain-Baum M, Schramm VL, Hanson RW: Mechanism of 3-mercaptopycolinic acid inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *J Biol Chem* 251:37-44, 1976
201. DiTullio NW, Berkoff CE, Blank B, Kostos V, Stack EJ, Saunders HL: 3-mercaptopycolinic acid, an inhibitor of gluconeogenesis. *Biochem J* 138:387-394, 1974



202. Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H: Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 32:107-108, 2002
203. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA: RNA interference in adult mice. *Nature* 418:38-39, 2002
204. Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ: Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1443-1448, 2002
205. Budker V, Zhang G, Knechtle S, Wolff JA: Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene Ther* 3:593-598, 1996
206. Zhang G, Vargo D, Budker V, Armstrong N, Knechtle S, Wolff JA: Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Hum Gene Ther* 8:1763-1772, 1997
207. Budker V, Zhang G, Danko I, Williams P, Wolff J: The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Ther* 5:272-276, 1998
208. Zhang G, Budker V, Williams P, Subbotin V, Wolff JA: Efficient expression of naked dna delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 12:427-438, 2001
209. Liu F, Song Y, Liu D: Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 6:1258-1266, 1999
210. Zhang G, Budker V, Wolff JA: High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 10:1735-1737, 1999
211. Kobayashi N, Kuramoto T, Yamaoka K, Hashida M, Takakura Y: Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J Pharmacol Exp Ther* 297:853-860, 2001
212. Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ, Dean DA, Liu D: Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther* 11:675-682, 2004
213. Kobayashi N, Nishikawa M, Hirata K, Takakura Y: Hydrodynamics-based procedure involves transient hyperpermeability in the hepatic cellular membrane: implication of a nonspecific process in efficient intracellular gene delivery. *J Gene Med* 6:584-592, 2004
214. Kobayashi N, Matsui Y, Kawase A, Hirata K, Miyagishi M, Taira K, Nishikawa M, Takakura Y: Vector-based in vivo RNA interference: dose- and time-dependent suppression of transgene expression. *J Pharmacol Exp Ther* 308:688-693, 2004
215. Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, Felig Y, Nussbaum O, Galun E: Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther* 8:769-776, 2003

216. Pruetz SB, Fan R, Zheng Q: Acute ethanol administration profoundly alters poly I:C-induced cytokine expression in mice by a mechanism that is not dependent on corticosterone. *Life Sci* 72:1825-1839, 2003
217. Szkudelski T: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:537-546, 2001
218. Zeini M, Hortelano S, Traves PG, Gomez-Valades AG, Pujol A, Perales JC, Bartrons R, Bosca L: Assessment of a dual regulatory role for NO in liver regeneration after partial hepatectomy: protection against apoptosis and retardation of hepatocyte proliferation. *Faseb J* 19:995-997, 2005
219. Ruijter JM, Gieling RG, Markman MM, Hagoort J, Lamers WH: Stereological measurement of porto-central gradients in gene expression in mouse liver. *Hepatology* 39:343-352, 2004
220. Narvaiza I, Aparicio O, Vera M, Razquin N, Bortolanza S, Prieto J, Fortes P: Effect of adenovirus-mediated RNA interference on endogenous microRNAs in a mouse model of multidrug resistance protein 2 gene silencing. *J Virol* 80:12236-12247, 2006
221. Foufelle F, Ferre P: New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* 366:377-391, 2002
222. 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: Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes* 53:560-569, 2004
223. Hrebicek J, Janout V, Malincikova J, Horakova D, Cizek L: Detection of insulin resistance by simple quantitative insulin sensitivity check index QUICKI for epidemiological assessment and prevention. *J Clin Endocrinol Metab* 87:144-147, 2002
224. Shao J, Yamashita H, Qiao L, Friedman JE: Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Lepr<sup>db</sup>/db mice. *J Endocrinol* 167:107-115, 2000
225. Ono H, Katagiri H, Funaki M, Anai M, Inukai K, Fukushima Y, Sakoda H, Ogihara T, Onishi Y, Fujishiro M, Kikuchi M, Oka Y, Asano T: Regulation of phosphoinositide metabolism, Akt phosphorylation, and glucose transport by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 15:1411-1422, 2001
226. Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Kreuzsch A, Saez E: The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445:219-223, 2007
227. Kuznetsov AV, Strobl D, Ruttman E, Konigsrainer A, Margreiter R, Gnaiger E: Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Anal Biochem* 305:186-194, 2002

228. Dhaunsi GS, Singh I, Orak JK, Singh AK: Antioxidant enzymes in ciprofibrate-induced oxidative stress. *Carcinogenesis* 15:1923-1930, 1994
229. Nakae J, Cao Y, Daitoku H, Fukamizu A, Ogawa W, Yano Y, Hayashi Y: The LXXLL motif of murine forkhead transcription factor FoxO1 mediates Sirt1-dependent transcriptional activity. *J Clin Invest* 116:2473-2483, 2006
230. Zhang Q, Wang SY, Fleuruel C, Leprince D, Rocheleau JV, Piston DW, Goodman RH: Metabolic regulation of SIRT1 transcription via a HIC1:CtBP corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:829-833, 2007
231. Rodgers JT, Puigserver P: Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12861-12866, 2007
232. Kim JK, Zisman A, Fillmore JJ, Peroni OD, Kotani K, Perret P, Zong H, Dong J, Kahn CR, Kahn BB, Shulman GI: Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. *J Clin Invest* 108:153-160, 2001
233. Zhao H, Yakar S, Gavrilova O, Sun H, Zhang Y, Kim H, Setser J, Jou W, LeRoith D: Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* 53:2901-2909, 2004
234. Kjørholt C, Akerfeldt MC, Biden TJ, Laybutt DR: Chronic hyperglycemia, independent of plasma lipid levels, is sufficient for the loss of beta-cell differentiation and secretory function in the db/db mouse model of diabetes. *Diabetes* 54:2755-2763, 2005
235. Browning JD, Horton JD: Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 114:147-152, 2004
236. Accili D: Lilly lecture 2003: the struggle for mastery in insulin action: from triumvirate to republic. *Diabetes* 53:1633-1642, 2004
237. Monetti M, Levin MC, Watt MJ, Sajan MP, Marmor S, Hubbard BK, Stevens RD, Bain JR, Newgard CB, Farese RV, Sr., Hevener AL, Farese RV, Jr.: Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab* 6:69-78, 2007
238. Hansmannel F, Mordier S, Iynedjian PB: Insulin induction of glucokinase and fatty acid synthase in hepatocytes: analysis of the roles of sterol-regulatory-element-binding protein-1c and liver X receptor. *Biochem J* 399:275-283, 2006
239. Gregori C, Guillet-Deniau I, Girard J, Decaux JF, Pichard AL: Insulin regulation of glucokinase gene expression: evidence against a role for sterol regulatory element binding protein 1 in primary hepatocytes. *FEBS Lett* 580:410-414, 2006

240. Drynan L, Quant PA, Zammit VA: Flux control exerted by mitochondrial outer membrane carnitine palmitoyltransferase over beta-oxidation, ketogenesis and tricarboxylic acid cycle activity in hepatocytes isolated from rats in different metabolic states. *Biochem J* 317 ( Pt 3):791-795, 1996
241. Kahn SE, Prigeon RL, Schwartz RS, Fujimoto WY, Knopp RH, Brunzell JD, Porte D, Jr.: Obesity, body fat distribution, insulin sensitivity and Islet beta-cell function as explanations for metabolic diversity. *J Nutr* 131:354S-360S, 2001
242. Beale EG, Hammer RE, Antoine B, Forest C: Glyceroneogenesis comes of age. *Faseb J* 16:1695-1696, 2002
243. Fulgencio JP, Kohl C, Girard J, Pegorier JP: Effect of metformin on fatty acid and glucose metabolism in freshly isolated hepatocytes and on specific gene expression in cultured hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 62:439-446, 2001
244. Haigis MC, Guarente LP: Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 20:2913-2921, 2006
245. Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, Zhai Q: SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab* 6:307-319, 2007
246. Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, McDonagh T, Lemieux M, McBurney M, Szilvasi A, Easlson EJ, Lin SJ, Guarente L: Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 4:e31, 2006
247. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L: Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429:771-776, 2004
248. Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P: Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *Embo J* 26:1913-1923, 2007
249. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA: Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337-342, 2006
250. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J: Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127:1109-1122, 2006
251. Dasgupta B, Milbrandt J: Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7217-7222, 2007

252. Schwer B, Verdin E: Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell Metab* 7:104-112, 2008
253. Tilghman SM, Belayew A: Transcriptional control of the murine albumin/alpha-fetoprotein locus during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:5254-5257, 1982
254. De Souza AT, Dai X, Spencer AG, Reppen T, Menzie A, Roesch PL, He Y, Caguyong MJ, Bloomer S, Herweijer H, Wolff JA, Hagstrom JE, Lewis DL, Linsley PS, Ulrich RG: Transcriptional and phenotypic comparisons of Ppara knockout and siRNA knockdown mice. *Nucleic Acids Res* 34:4486-4494, 2006
255. Christoph T, Grunweller A, Mika J, Schafer MK, Wade EJ, Weihe E, Erdmann VA, Frank R, Gillen C, Kurreck J: Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 350:238-243, 2006
256. Groen AK, van Roermund CW, Vervoorn RC, Tager JM: Control of gluconeogenesis in rat liver cells. Flux control coefficients of the enzymes in the gluconeogenic pathway in the absence and presence of glucagon. *Biochem J* 237:379-389, 1986
257. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J: Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193-199, 1991
258. Petrescu I, Bojan O, Saied M, Barzu O, Schmidt F, Kuhnle HF: Determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity with deoxyguanosine 5'-diphosphate as nucleotide substrate. *Anal Biochem* 96:279-281, 1979
259. Salmon DM, Flatt JP: Effect of dietary fat content on the incidence of obesity among ad libitum fed mice. *Int J Obes* 9:443-449, 1985
260. Demoz A, Garras A, Asiedu DK, Netteland B, Berge RK: Rapid method for the separation and detection of tissue short-chain coenzyme A esters by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 667:148-152, 1995
261. Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H: Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol Sci* 67:322-328, 2002



*Success is going from failure to failure  
without loss of enthusiasm*

Winston Churchill





---

**PUBLICACIONES**

---



# Overcoming Diabetes-Induced Hyperglycemia through Inhibition of Hepatic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) with RNAi

Alicia G. Gómez-Valadés,<sup>1</sup> Anna Vidal-Alabró,<sup>1</sup> Maria Molas,<sup>1</sup> Jordi Boada,<sup>1</sup> Jordi Bermúdez,<sup>1</sup> Ramon Bartrons,<sup>2</sup> and José C. Perales<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Biophysics Unit and <sup>2</sup>Biochemistry Unit, Department of Physiological Sciences II, IDIBELL—University of Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet del Llobregat, Spain

\*To whom correspondence and reprint requests should be addressed at the Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet, Spain. Fax: +34 93 4024268. E-mail: jperales@ub.edu.

Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK; EC 4.1.1.32) is the rate-controlling enzyme in gluconeogenesis. In diabetic individuals, altered rates of gluconeogenesis are responsible for increased hepatic glucose output and sustained hyperglycemia. Liver-specific inhibition of PEPCK has not been assessed to date as a treatment for diabetes. We have designed a therapeutic, vector-based RNAi approach to induce posttranscriptional gene silencing of hepatic PEPCK using nonviral gene delivery. A transient reduction of PEPCK enzymatic activity ( $7.6 \pm 0.6$  vs  $9.7 \pm 1.1$  mU/mg,  $P < 0.05$ ) that correlated with decreased protein content of up to 50% was achieved using this strategy in diabetic mice. PEPCK partial silencing was sufficient to demonstrate lowered blood glucose ( $218 \pm 26$  vs  $364 \pm 33$  mg/dl,  $P < 0.001$ ) and improved glucose tolerance together with decreased circulating FFA ( $0.89 \pm 0.10$  vs  $1.44 \pm 0.11$  mEq/dl,  $P < 0.001$ ) and TAG ( $65 \pm 11$  vs  $102 \pm 16$  mg/dl,  $P < 0.01$ ), in the absence of liver steatosis or lactic acidosis. SREBP1c was down-regulated in PEPCK-silenced animals, suggesting a role for this pathway in the alterations of lipid metabolism. These data reinforce the significance of PEPCK in sustaining diabetes-induced hyperglycemia and validate liver-specific intervention at the level of PEPCK for diabetes gene therapy.

**Key Words:** phosphoenolpyruvate carboxykinase, diabetes mellitus, hydrodynamic gene transfer, RNA interference, gluconeogenesis

## INTRODUCTION

Gluconeogenesis is responsible for sustained production of glucose in fasting animals [1,2]. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)<sup>3</sup> catalyzes the formation of phosphoenolpyruvate from oxaloacetate, the rate-controlling step in the gluconeogenic pathway. In addition, a significant role of the enzyme in the regulation of energy homeostasis and flux through the TCA cycle has been recently demonstrated in a liver-specific gene-deletion

mouse model [3]. PEPCK is also involved in the control of acid-base in the kidney [4,5], glyceroneogenesis in adipose tissue [5,6], and glutamine metabolism in small intestine [5,7]. In diabetic individuals, altered rates of gluconeogenesis are responsible for increased hepatic glucose output (HGO) and, therefore, sustained hyperglycemia observed in both IDDM and NIDDM [8,9]. Expression from the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C) is induced during diabetes, both in animals and in human patients and this induction correlates with the increased rate of gluconeogenesis in liver and kidney [10].

Several pathways involved in energy metabolism are altered in the liver, adipose tissue, and muscle during diabetes. These alterations are secondary to a resistance to insulin signaling (NIDDM) or a reduced concentration of insulin (IDDM). The mechanism of action of current

<sup>3</sup>Abbreviations used: PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; NIDDM, non-insulin-dependent diabetes mellitus; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; TZD, thiazolidinediones; Gly, glycogen; PKR, protein kinase R; poly(dI:dC), poly(deoxyinosine:deoxycytosine); ACC-P, phosphorylated acetyl-CoA carboxylase, FAS, fatty acid synthase; SREBP1c, sterol regulatory element binding protein 1c.

drugs for the treatment of NIDDM, biguanides (e.g., metformin) and thiazolidinediones (e.g., rosiglitazone) [11,12], induces an increase in insulin sensitivity in peripheral tissues and the liver. The antihyperglycemic action of thiazolidinediones is a direct result of activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) [13], whereas metformin has been linked directly to inhibition of liver gluconeogenesis [14,15]. However, these drugs activate upstream regulators (e.g., PPAR- $\gamma$  or AMP-K) that are involved in a broad range of physiological functions [13,16–19].

Because of the theoretical potential of blocking HGO by means of a specific inhibition of a key enzymatic step in the pathway, we have aimed at down-regulating hepatic PEPCK-C. To accomplish this goal, we have developed specific short-hairpin RNA (shRNA) reagents to knock down PEPCK-C and achieved organ specificity using liver-directed transfection. Silencing of endogenous genes mediated by RNA interference is a conserved biological process that can be used to induce experimental sequence-specific gene silencing with either small interference duplexes (siRNA) or shRNA expression vectors. This kind of vector drives shRNA expression from a human U6 promoter and their efficacy has been demonstrated both in mammalian cells [20] and in mice after hepatic hydrodynamic gene delivery [21].

We report here an efficient reduction in the levels of mRNA, protein, and enzyme activity of hepatic PEPCK-C in animals treated with specific shRNAs. As a result, plasma glucose of diabetic mice was reduced up to 40%, with no associated lactic acidosis or hepatic steatosis. We demonstrate that the inhibition of PEPCK-C gene expres-

sion using shRNA also results in alterations in lipid metabolism, exemplified by reduced serum NEFA and triglycerides (TAG) in parallel to a clear reduction of both precursor and mature forms of the key lipogenic transcription factor SREBP1c. Hence, liver-specific PEPCK gene silencing provides a novel therapeutic approach for the treatment of diabetes.

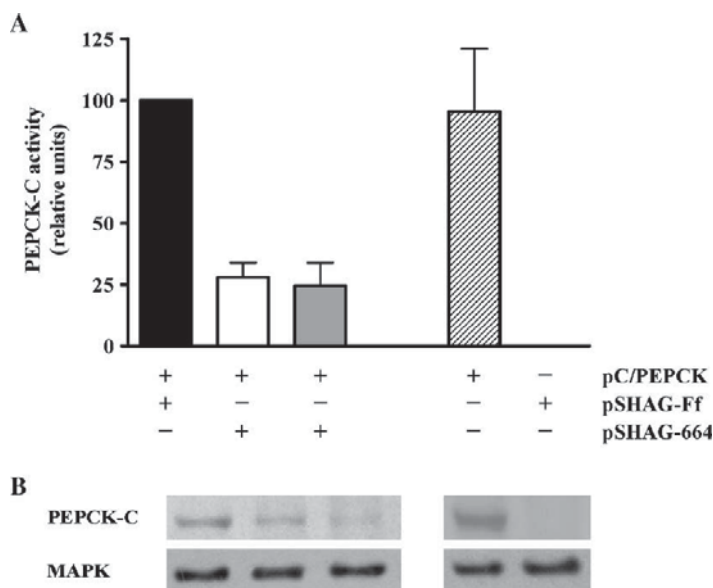
## RESULTS

### PEPCK-C Gene Silencing by Means of shRNA Expression *in Vitro*

We generated two mammalian expression cassettes containing the human U6 polymerase III gene promoter driving expression of shRNAs (pSHAG vector) complementary to both mouse and rat PEPCK-C transcripts. Both sequences were designed with homology to a 29-bp stretch from nucleotides 482 and 664 of the cDNA (pSHAG-482 and pSHAG-664, respectively). We used an equivalent cassette expressing a shRNA specific for a *Photinus pyralis* luciferase sequence (pSHAG-Ff) as a control.

We confirmed efficient silencing of the gene for PEPCK-C in Huh-7 cells using cotransfection experiments with a constant amount of PEPCK-C expression vector (pC/PEPCK-C) and different molar ratios (1:6 and 1:12) of the silencing vectors (664, 482, or Ff). Cotransfection of pSHAG-Ff, whatever the ratio used, never altered PEPCK-C activity or protein levels. In contrast, as shown in Fig. 1, PEPCK-C activity and protein levels significantly decreased when pSHAG-664 and pC/PEPCK-C plasmids were cotransfected. The suppression of PEPCK-C was close to 80% as determined by enzyme activity and

FIG. 1. pSHAG-664 induces PEPCK gene silencing *in vitro*. (A) pC/PEPCK-C (2.25  $\mu$ g) was cotransfected with different molar ratios of pSHAG-664 (1:0 (striped), 1:6 (white), and 1:12 (gray)). As a control for nonspecific gene silencing pSHAG-Ff was cotransfected at a 1:24 ratio (black). pBlue-script was used as stuffer. As an internal transfection control, 1  $\mu$ g of pGL3 was added to all plates. PEPCK-C activity was measured 48 h after transfection and normalized for luciferase activity. Data are expressed as relative PEPCK activity (PEPCK activity/luciferase activity). (B) Silencing was confirmed at the protein level using Western blot. A representative blot is shown.



doi:10.1016/j.ymthe.2005.08.026

Western blot at both 1:6 and 1:12 molar ratios (Fig. 1), whereas pSHAG-482 inhibited PEPCK-C gene expression with a lower efficiency (data not shown).

### Hepatic Gene Silencing *in Vivo* Using Hydrodynamic Gene Transfer

Hydrodynamic gene transfer is an efficient and convenient method for preferential transfection of DNA to the liver [22,23]. Since we aimed at down-regulating hepatic PEPCK-C, hydrodynamic gene transfer seemed an appropriate tool to achieve our objective. We, therefore, assessed the efficiency of shRNA silencing *in vivo* using a validation model whereby luciferase gene expression in the liver was induced by transfection of a luciferase expression vector (pGL3) cotransfected with pSHAG-Ff, a luciferase-specific silencing vector. Luciferase activity was inhibited by about 98% in mice treated with pSHAG-Ff compared with animals injected with reporter vector alone or nonspecific pSHAG (Fig. 2). Luciferase activity was undetectable in kidney extracts after pGL3 injection (data not shown). This experiment demonstrates specific and efficient silencing in the liver mediated by shRNA and validates the experimental system.

### Specific Silencing of Endogenous PEPCK-C in Healthy Animals

We demonstrated silencing of endogenous PEPCK-C gene expression in healthy animals 24 h after tail vein injection with pSHAG-664 plasmid. We noted a reduction in PEPCK-C mRNA content independent of the nutritional status (fed or 24 h fasted) and it was statistically significant (40% reduction) in fed animals (Fig. 3A). Moreover, hepatic PEPCK-C activity after 24 h fasting was decreased by 30% compared with pSHAG-Ff ( $20 \pm 1.98$  vs  $28.5 \pm 1.89$  mU/mg protein,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 3B). We found no

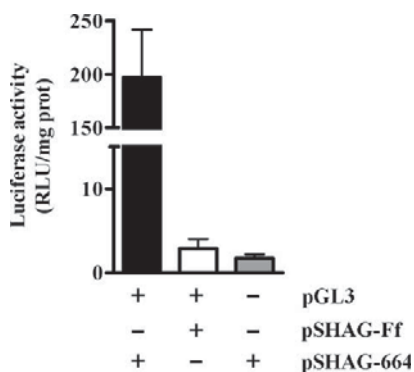


FIG. 2. Liver-specific RNAi-induced gene silencing using hydrodynamic gene transfer. Luciferase expression vector pGL3 (10  $\mu$ g) was co-injected with specific (pSHAG-Ff) or nonspecific (pSHAG-664) shRNA at a 1:6 molar ratio, using the hydrodynamic method. Luciferase activity was assayed 72 h later in liver extracts ( $n = 3$ ).

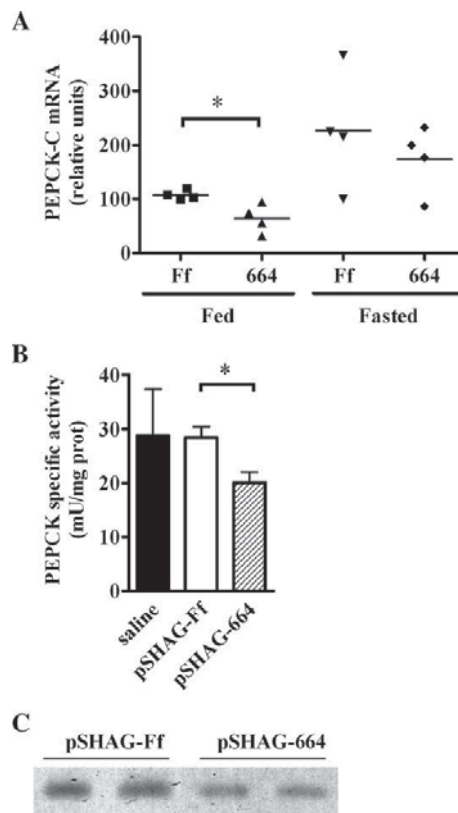


FIG. 3. PEPCK-C gene silencing in healthy mice. Analysis of the silencing capacity of pSHAG-664 in nondiabetic mice assessed at the mRNA, enzyme activity, and protein levels. Mice were injected in the tail vein with 10% (w/v) physiological saline solution containing 100  $\mu$ g of either pSHAG-664 or pSHAG-Ff plasmid. Silencing of PEPCK-C was assayed 24 h later. (A) Hepatic PEPCK mRNA content was analyzed from fed and 24-h fasted mice by Northern blot and is represented as the relative amount of PEPCK-C mRNA with respect to GAPDH mRNA. (B) Specific PEPCK activity in liver extracts from fasted animals is presented. Values are expressed as the means  $\pm$  SE ( $n = 4$ ,  $*P < 0.05$ ). (C) Further confirmation of PEPCK silencing was obtained by analysis of the PEPCK-C protein content by Western blot. Representative blots are shown ( $n = 4$ ).

significant reduction in PEPCK-C activity or protein in kidney compared with pSHAG-Ff or saline groups (data not shown). In the liver, and correlating with effects observed on mRNA content and enzymatic activity, protein levels were also reduced as determined by Western blot analysis (Fig. 3C). These animals remained euglycemic and euinsulinemic, and we noted no lactic acidosis or change in serum or hepatic lipids (data not shown).

### Silencing of Liver PEPCK-C in Streptozotocin-Treated Animals

To assess whether the inhibition of PEPCK-C in the liver could be a feasible strategy to overcome fasting hyper-

glycemia in diabetic animal models and to study the metabolic implications of such inhibition, we introduced pSHAG-664 into the liver of streptozotocin (STZ)-treated mice. At the time of injection, mice were hyperglycemic (>400 mg/dl) and weighed 20–25 g. Only animals that maintained their weight above 20 g during the course of the experiment were further analyzed. We used 3-mercaptopicolinic acid (3-MPA), a well-known noncompetitive inhibitor of PEPCK-C, as a positive control for the systemic inhibition of gluconeogenesis in these animals.

We carried out tail vein injections with 100  $\mu$ g of pSHAG-Ff or pSHAG-664. We analyzed weight and glycemia at 48 and 72 h postinjection after a short fast. We observed the greatest hypoglycemic effect 2 days after treatment with pSHAG-664, when fasting blood glucose concentration was dramatically reduced (40%) compared to control (pSHAG-Ff) animals ( $218 \pm 26$  vs  $364 \pm 33$  mg/dl,  $n = 26$  and  $n = 25$ ,  $P < 0.001$ ), similar to 3-MPA-treated diabetic mice ( $149 \pm 30$  mg/dl). Overt hypoglycemia (blood glucose concentration below 30 mg/dl) was not observed in any of the animals treated. Three days after treatment glycemia in the treated group was reduced by approximately 25% ( $350 \pm 68$  vs  $476 \pm 35$  mg/dl,  $n = 10$  and  $n = 12$ ,  $P = 0.05$ ) (Fig. 4A). These data suggest a progressive loss of expression from the injected vector DNA in good agreement with previously reported transient expression of silencing vectors introduced by hydrodynamic gene transfer [24].

In addition, we performed an intraperitoneal glucose tolerance test 48 h after injection of pSHAG expression vector. At the time of initiation of the experiment, the fasting glucose concentration in treated animals (pSHAG-664) was about 40% lower than in controls (pSHAG-Ff) ( $111 \pm 30$  vs  $272 \pm 47$  mg/dl,  $P < 0.01$ ,  $n = 5$ ). Diabetic animals treated with pSHAG-664 showed a normalized glucose tolerance compared to healthy mice (Fig. 4B).

PEPCK-C protein content in the liver, as analyzed using Western blot, was also transiently silenced, correlating with significant enzyme activity changes (approximately 20% decrease) demonstrated 72 h after injection ( $9.7 \pm 1.1$  vs  $7.6 \pm 0.6$  mU/mg protein,  $n = 9$  and  $n = 7$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 5).

The concentrations of TAG and free fatty acids (FFA) in serum were significantly lower in PEPCK-silenced animals 48 h after injection. This reduction was also transient; we observed no differences at 72 h postinjection. Accompanying the decrease in serum FFA, we observed a nonsignificant increase in serum  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -HBA) (Table 1). Liver glycogen content was dramatically decreased at 48 h, whereas we observed a less pronounced reduction 72 h after treatment. In addition, we observed a significant increase in the activity of lactate dehydrogenase (LDH) 72 h after injection.

To gain insight into the regulatory mechanisms involved in altered lipid metabolism in the livers of treated animals, we performed specific immunoblotting

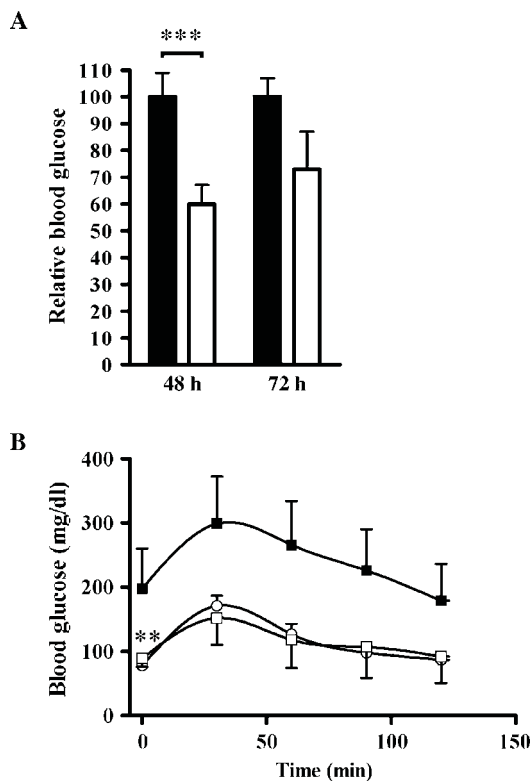
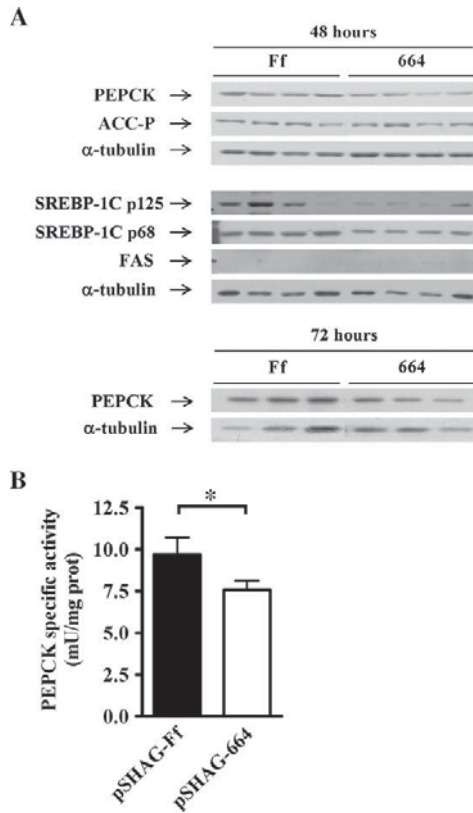


FIG. 4. Blood glucose and glucose tolerance after silencing PEPCK-C in the livers of diabetic animals. (A) Streptozotocin-induced diabetic mice received an intravenous injection as explained under Materials and methods with 100  $\mu$ g of either pSHAG-Ff (solid bars) or pSHAG-664 (empty bars). Glycemia at 48 h (pSHAG-Ff,  $n = 26$ , and pSHAG-664,  $n = 25$ ,  $***P < 0.001$ ) and 72 h (pSHAG-Ff,  $n = 12$ , and pSHAG-664,  $n = 10$ ,  $P = 0.05$ ) in 8-h fasted animals is presented. Results are expressed as relative glycemia. (B) A glucose tolerance test was performed at 48 h after hydrodynamic gene transfer by ip injection of a glucose bolus (1 mg/g) in pSHAG-Ff (filled squares), pSHAG-664 (empty squares), and healthy control animals (empty circles). Values are the means  $\pm$  SE ( $n = 5$ ,  $**P < 0.01$ ).

against key regulatory proteins involved in lipogenesis (SREBP1c and FAS) and fatty acid  $\beta$ -oxidation (ACC-P) in whole liver extracts (Fig. 5). A very profound down-regulation of SREBP1c, precursor (p125) and mature (p68) forms, paralleled PEPCK silencing, whereas we found no significant changes in ACC-P or FAS. Densitometric analysis of the blots demonstrated an 82 and 38% reduction in p125 and p68 SREBP1c forms, respectively.

#### Green Fluorescent Protein (GFP) Expression and PEPCK-C Immunohistochemistry after Hydrodynamic Gene Transfer

To assess whether the percentage of hepatocytes transfected using the hydrodynamic procedure correlates with silencing efficiency of endogenous PEPCK-C, we injected



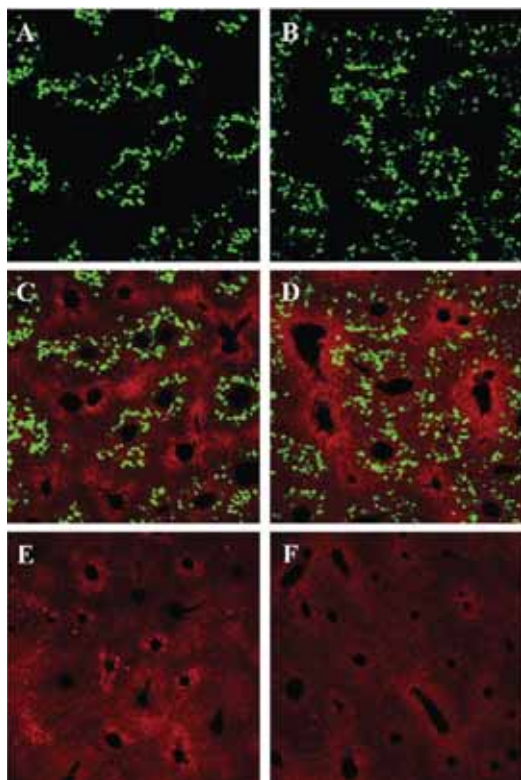
**FIG. 5.** PEPCK-C silencing in the liver of diabetic mice. Mice received an intravenous injection of pSHAG-Ff or pSHAG-664 (100 µg). Liver extracts were prepared from animals at 48 and 72 h after injection as described under Materials and Methods. PEPCK content was analyzed by Western blot and enzymatic activity. In addition, the level of a number of key proteins involved in the regulation of energy metabolism was analyzed. (A) Representative blots from independent experiments are shown. (B) PEPCK specific activity 72 h after the injection is shown. Values are the means ± SE (\**P* < 0.05).

diabetic mice with various amounts of pEGFP. We assessed hepatic distribution of GFP and PEPCK-C proteins using direct (GFP) and indirect (PEPCK immunohistochemistry) fluorescence under confocal microscopy 48 h after the injection. Compared with uninjected animals, GFP expression was easily detected in liver sections and the amount of GFP-positive cells increased with the dose of DNA injected (Figs. 6A and 6B). More intense PEPCK-C immunostaining was localized in the periportal zone, which is characteristic of this gene. Strikingly, GFP-positive hepatocytes were localized in the lower part of the gradient of PEPCK-C immunoreactivity (perivenous and intermediate zone), with a broader distribution apparent when a higher dose of plasmid was injected (Figs. 6C and 6D). These data are consistent with gene

**TABLE 1: Metabolic profile after partial liver PEPCK-C silencing in diabetic mice**

	Blood Glucose (mg/dl)	TAG (mg/dl)	β-HBA (mmol/L)	FFA (mEq/L)	Lactate (mg/dl)	Insulin (µg/L)	GPT (U/L)	TAG (mg/g)	Liver LDH (mU/mg)	Gly (mM/g)
48 h pSHAG-Ff (mean ± SE)	364 ± 33	102 ± 16	0.25 ± 0.08	1.44 ± 0.11	73.6 ± 7.9	0.11 ± 0.04	112 ± 16	12.7 ± 0.5	nd	43.9 ± 5.2
pSHAG-664 (mean ± SE)	218 ± 26***	65 ± 11**	0.38 ± 0.14	0.89 ± 0.10***	63.4 ± 6.0	0.13 ± 0.02	142 ± 21	13.1 ± 0.3	nd	12.7 ± 7.0**
72 h pSHAG-Ff (mean ± SE)	476 ± 35	83.8 ± 10.8	0.19 ± 0.05	1.1 ± 0.2	41.3 ± 6.4	nd	36.9 ± 6.4	13.3 ± 0.7	10.1 ± 0.0	49.9 ± 3.6
pSHAG-664 (mean ± SE)	350 ± 68 (P = 0.05)	89.4 ± 14.1	0.24 ± 0.11	1.3 ± 0.4	44.2 ± 9.9	nd	47.0 ± 8.9	11.2 ± 0.6	13.8 ± 0.0**	30.5 ± 8.0*

Streptozotocin-induced diabetic mice were injected with 100 µg of pSHAG-Ff or pSHAG-664. Liver and serum metabolite measurements were performed at different times (48 and 72 h) as described under Materials and Methods. Data are means ± SE of 7–12 animals except for blood glucose (n = 26 pSHAG-Ff and n = 25 pSHAG-664). nd, not determined.  
 \* *P* < 0.05.  
 \*\* *P* < 0.01.  
 \*\*\* *P* < 0.001.



**FIG. 6.** Zonal expression in the liver after hydrodynamic gene delivery promotes partial PEPCK-C silencing throughout the liver parenchyma. Mice were injected with either (A to D) 10 or 20  $\mu\text{g}$  of pEGFP or (E and F) 100  $\mu\text{g}$  of pSHAG using the hydrodynamics procedure. Direct visualization of GFP (green) and indirect immunodetection of PEPCK (red) on fixed liver sections were analyzed using confocal microscopy. (A and B) correspond to representative fields of hepatic GFP distribution after hydrodynamic gene transfer at either 10 or 20  $\mu\text{g}$  dose, respectively. Colocalization of GFP and PEPCK signals at the indicated doses (C, 10  $\mu\text{g}$ , and D, 20  $\mu\text{g}$ ) in fixed liver sections is also shown. Representative PEPCK immunostaining after transfection of 100  $\mu\text{g}$  pSHAG-Ff (E) or pSHAG-664 (F) is shown. Original magnification, 200 $\times$ .

transfer to an area corresponding to the periportal and intermediate hepatic acinus regions and are in agreement with the metabolic zonation of the liver [25]. From these results one might infer that the relative distribution in the liver lobule of hepatic PEPCK-C and transgene expression using hydrodynamic gene transfer might provide an explanation for the partial silencing of hepatic PEPCK-C reported here. Nevertheless, it is important to note that after pSHAG-664 transfection (100  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ), PEPCK-C immunostaining is reduced globally (Figs. 6E and 6F); that is, the periportal–periportal intensity gradient is partially lost, suggesting that PEPCK-C is being knocked down not only in the periportal and intermediate zone, but also in the periportal area.

### Nonspecific Gene Silencing via PKR/Interferon Pathway

Systemic and/or nonspecific suppression of transcription due to dsRNA-induced PKR/interferon stress response has been previously demonstrated using specific siRNA sequences and RNAi vectors [26,27]. To discard the induction of this pathway in treated animals, we investigated the level of activation of downstream targets of PKR, i.e., increased phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) in liver extracts [26] and the production of IL-12 [28].

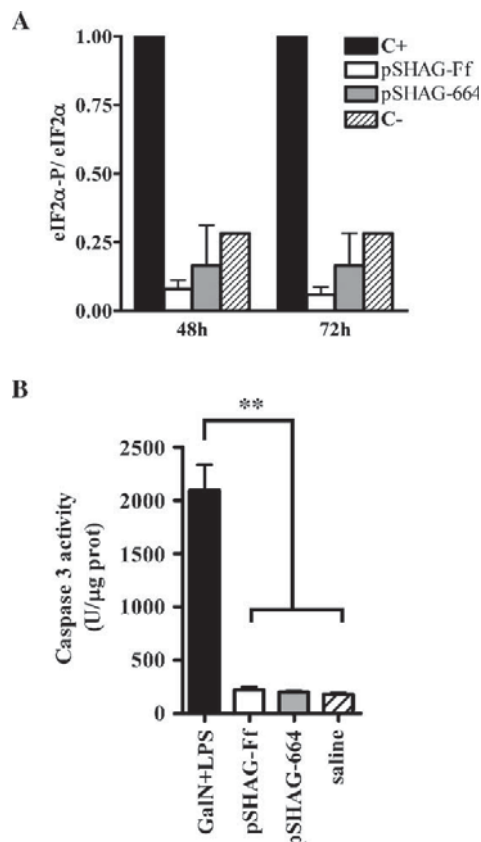
We used poly(dI:dC), a well-known dsRNA analogue, as a positive control for PKR-dependent stimulation of eIF2 $\alpha$  phosphorylation in the liver. We observed that poly(dI:dC) injection induced 3- to 26-fold higher levels of phosphorylated eIF2 $\alpha$  compared to pSHAG treatment. Moreover, treatments with shRNA vectors did not increase the level of eIF2 $\alpha$  phosphorylation compared with control saline-injected animals (Fig. 7A). eIF2 $\alpha$  activation (ratio of phosphorylated over total protein) was comparable among the various pSHAG-injected (both Ff and 664 groups) and control (saline-injected) livers. Furthermore, the levels of IL-12 in plasma were not altered by pSHAG gene transfer (data not shown), altogether discarding nonspecific silencing induced by a PKR/interferon-mediated response.

Hydrodynamic gene transfer has also been shown to induce transient liver damage [23] resulting in increased serum transaminase levels immediately after injection and a return to near normal levels by 48–72 h. However, the degree of damage induced by hydrodynamic gene transfer in the liver of STZ-administered mice has not been assessed to date. Therefore, to discard nonspecific effects due to gene transfer we have performed both serum transaminase (GPT) measurements and caspase 3 activation analysis in whole-cell liver extracts from treated animals. The levels of GPT were significantly above saline ip-injected controls ( $27.0 \pm 2.4$ ,  $n = 5$ ) 48 h after injection and returned to control values by 72 h (Table 1). Importantly, we observed no significant differences between transfected groups at either time point. In addition, we investigated long-term deleterious consequences on hepatocyte viability using a general apoptosis induction analysis involving the determination of caspase 3 activity in whole-cell liver extracts (Fig. 7B). These data demonstrated that gene transfer by hydrodynamic injection did not induce apoptosis compared to saline ip-injected controls in marked contrast with galactosamine/lipopolysaccharide (LPS) induction [29] used as a positive control.

### DISCUSSION

Pharmacological intervention in diabetes focuses on a series of targets, including  $\beta$ -cell function (sulfonylureas) [30], FFA reesterification in adipose tissue (TZD),





**FIG. 7.** PKR/interferon or apoptosis pathways are not activated upon pSHAG hydrodynamic injection. Positive control (C+) for PKR/interferon pathway activation was obtained from liver extracts of diabetic mice injected ip with 50  $\mu$ g of a dsRNA analogue (poly(dI:dC)). Negative controls (C-) were saline-injected mice. eIF2 $\alpha$  and eIF2 $\alpha$ -P were detected by Western blot performed with liver extracts from the various groups. (A) Results are presented as the ratio of the phosphorylated form versus total eIF2 $\alpha$  after densitometric analysis of the blots ( $n = 5$ ). (B) Caspase 3 activity in liver extracts from healthy mice following hydrodynamic injection of with 100  $\mu$ g of either pSHAG Ff or pSHAG 664 ( $n = 7$ ). Positive control for hepatic apoptosis induction was obtained from liver extracts of mice injected ip with 700 mg/kg galactosamine and 100 mg/kg LPS ( $n = 3$ ). Negative controls were ip saline-injected mice ( $n = 3$ ).

insulin sensitivity in the muscle (TZD) [13,31], and glucose output in the liver (metformin) [15,32]. Despite recognition through extensive investigation of the critical role that PEPCK exerts in controlling gluconeogenesis in the liver [1,3,9,33,34], the validation of this enzyme as a target for liver-specific gene therapy or pharmacological intervention in diabetes has not been extensively investigated to date. Therefore, we have developed a therapeutic, vector-based RNAi approach *in vivo* to validate liver PEPCK as a target for diabetes gene therapy.

Silencing vectors (Fig. 1), together with liver-specific gene transfer (achieved using a hydrodynamic-based procedure) (Fig. 2), provide the model to evaluate the efficacy and metabolic alterations induced by PEPCK inhibition in the liver. Initially, we confirmed that the silencing vector was able to down-regulate endogenous PEPCK in healthy mice. These data demonstrated an increased capacity to silence PEPCK-C in fed (Fig. 3A) versus fasted animals, probably related to increased target mRNA levels after transcription up-regulation of PEPCK-C induced by fasting [25]. Nevertheless, even in fasted animals, a significant reduction in PEPCK-C activity and protein was detected after injection of pSHAG-664 although the reduction of PEPCK-C mRNA was significant only in fed animals (Fig. 3). This reduction was not accompanied by changes in carbohydrate or lipid metabolites in healthy mice, as expected from a partial inhibition of the gene and in contrast to results obtained by a complete ablation of hepatic PEPCK-C [3].

In diabetic animals, treatment with pSHAG-664 silencing vector also showed a significant reduction in PEPCK protein and enzyme activity that correlated with a significant reduction of blood glucose levels and improved glucose tolerance in the absence of insulin or stimulation of insulin release by the treatment (Table 1). Such a large impact in glucose homeostasis after a partial reduction in liver PEPCK-C reinforces the importance of this gluconeogenic enzyme in sustaining fasting hyperglycemia in diabetes [9,14,35]. Apart from a clear hypoglycemic effect, partial silencing of liver PEPCK-C demonstrated several other metabolic consequences. Liver glycogen and serum FFA and TAG were significantly reduced, concomitant with increased liver LDH activity and a tendency toward increased serum  $\beta$ -HBA. The implications of these changes are severalfold. First of all, a decrease in glycogen stores in treated animals might reflect a diminished glycogen synthesis from gluconeogenic precursors, in agreement with previous observations describing a liver-specific PEPCK-C knockout [3]. Second, lower plasma FFA, correlating with increased serum  $\beta$ -HBA levels, suggests a higher rate of FFA uptake and  $\beta$ -oxidation. These data might be partially explained by the maintenance of O<sub>2</sub> consumption observed in perfused liver after acute inhibition of gluconeogenesis [36], an indirect measure of the level of  $\beta$ -oxidation in gluconeogenic liver. Increased FFA oxidation could be secondary to an increase in either mitochondrial or extramitochondrial (peroxisomal) oxidation. Immunoblotting analysis of key targets of regulatory pathways involved in energy metabolism such as phosphorylated ACC, FAS, and SREBP1c have confirmed no significant changes in the level of ACC phosphorylation. On the other hand, SREBP1c, both precursor (p125) and mature (p68) forms, were very significantly reduced, suggesting an inhibition of its transcription and arguing for an inhibitory effect of elevated concentra-

tions of fatty acids on glucose metabolism and lipogenesis [37]. Animals treated with streptozotocin at the doses utilized in these experiments have remarkably low levels of insulin (Table 1). However, insulin-independent expression of SREBP1c in liver extracts of STZ-treated mice has been previously described [38] and is also apparent in the liver of mice shown here (Fig. 5). Therefore, glucose metabolism is sufficiently active to sustain a certain level of glucose uptake [38] that could be diverted from lipogenesis to glycolysis after SREBP1c inhibition in pSHAG 664 injected animals. It is therefore tempting to speculate that a yet to be identified energy sensing mechanism would induce FFA uptake and activation, resulting in down-regulation of SREBP1c that in turn would inhibit TAG synthesis and release from the liver. In fact, the ratio of ACC-P/SREBP1c in PEPCK-silenced animals is much higher, suggesting an increased flux from FFA synthesis to oxidation. Conversely, a significant reduction in glycemia as observed upon PEPCK partial silencing would down-regulate SREBP1c transcription indirectly since plasma glucose levels can affect the levels of SREBP1c directly in the liver of streptozotocin-treated mice [38].

In the present report we show transient silencing using hydrodynamic gene transfer of RNAi-inducing vectors, in agreement with the reported duration of gene expression after hydrodynamic transfection (72–96 h) [24]. However, we cannot rule out that the transitory biological effect observed is due to a feedback regulation responsible for steady-state maintenance of gluconeogenesis upon stimulation of PEPCK transcription.

We and others [22,39] have shown up to 40% hepatocyte transfection using this procedure, although the zonal distribution of hepatocyte delivery has not been reported to date. This issue is of special importance due to metabolic zonation of PEPCK-C (a decreasing gradient through the portocentral axis) in the liver [40]. Nevertheless, during fasting or diabetes the absolute increase in the concentration of PEPCK mRNA is similar throughout the liver [25]. Our results show extensive immunolocalization of PEPCK throughout the entire liver and quantitative compartmentalization of PEPCK-C in periportal hepatocytes, whereas GFP expression after hydrodynamic injection colocalizes to a discrete compartment corresponding to a more perivenous zone (Fig. 6). Nevertheless, the distribution and levels of transgene expression broaden in a dose-dependent manner as seen by the increasing number of GFP-expressing hepatocytes obtained when injecting 20  $\mu$ g versus 10  $\mu$ g of the reporter plasmid. Consequently, upon injection of 100  $\mu$ g of therapeutic plasmids, silencing of the endogenous PEPCK-C gene might achieve a broader distribution. In fact, direct immunohistochemistry for PEPCK-C after hydrodynamic gene transfer of 100  $\mu$ g of pSHAG showed lower immunostaining throughout the liver parenchyma with a partial loss of the portocentral PEPCK-C gradient.

Taking into consideration the concept of metabolic zonation in the liver and the incomplete colocalization of the transgene and PEPCK-C, one might infer that the combination of shRNA expression vectors and hydrodynamic gene transfer would lead to a partial silencing of the hepatic PEPCK-C. Data presented in this article confirm this possibility.

This study demonstrates acute effects of a partial reduction of gluconeogenesis in the diabetic liver. Therefore, it is not clear whether the changes observed could be sustained over time in this model. However, preliminary data from our group suggest that a longer lasting expression of pSHAG-664 in diabetic db/db mice results in a significant decrease in glycemia, as well as weight gain, both in fed and in fasted animals, that was maintained for as long as 7 days. All in all, these data support the notion that PEPCK-C not only is a gluconeogenic enzyme, but also has an important role in cataplerosis [5], glyceroneogenesis, and the triglyceride cycle flux control [41], and its deregulation is implicated in the development of obesity and diabetes [35].

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Polyethylenimine (PEI) was from Aldrich (PEI 25,000 Da; Cat. No. 40,872-7; Steinheim, Germany). Media, sera, and antibiotics were obtained from Life Technologies, Inc. (Grand Island, NY, USA). Poly(dI:dC) was purchased from Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ, USA) and 3-MPA from Toronto Research Chemicals, Inc. (North York, ON, Canada). Galactosamine and LPS from *Escherichia coli* 0111:B4 were from Sigma (St. Louis, MO, USA).

**Plasmids.** pEGFP was purchased from Clontech (Palo Alto, CA, USA) and contains an early cytomegalovirus promoter and an enhanced green fluorescent protein. The firefly (*P. pyralis*) luciferase reporter vector (pGL3) was obtained from Promega (Madison, WI, USA). The cDNA for rat cytosolic PEPCK-C was kindly provided by Dr. Richard W. Hanson (Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA) and it was cloned into the *Bam*HI–*Bgl*III site of a pCAGGS vector (pC/PEPCK), which allows high levels of transgene expression [42]. Short-hairpin RNA expression vectors pSHAG-Ff and pSHAG-1 were a kind gift from Dr. Greg Hannon (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA). pSHAG-1 contains the U6 promoter region from –265 to +1, a cloning site for short-hairpin RNAs (*Bam*HI–*Bse*RI), and a U6 terminator sequence. pSHAG-Ff contains the U6 promoter followed by a short-hairpin RNA directed against *P. pyralis* luciferase [20,43]. Two shRNA sets of oligonucleotides targeted against rat and mouse PEPCK-C mRNA were designed utilizing a published algorithm [20,43] available at <http://katahdin.cshl.org:9331/siRNA/html/shrna>. The first shRNA targeted a sequence that starts at nucleotide 482 from the start site of translation (5'-CATGCTGGCCACCACATAGGGCGAGTCTGAAGCTTGAGACTCGTCTATGTGGTGGCCGGCGTGTGGTTTTT-3' and 5'-GATCAAAAACGGTGTAGCCATACTAGCCAATGCGCCAGATCAAGCTT-CACCTGGCCGACTGGCTGAGCATGGCCACG-3'). The second targeted a sequence that starts at nucleotide 664 from the start site of translation (5'-AGGAGATGATCTCTCTGCGGTCCGGGAGAAGCTTGTCCGGATCCG-CAGGGAGATTATCTCCTCGGTTTTT-3' and 5'-GATCAAAAACCGGAAG-GAGATAATCTCCCTCGATCCGGAACAAGCTTCTCTGACCCGACAGAGATCATCTCTCTCG-3'). Each pair of primers was annealed and cloned into *Bam*HI–*Bse*RI of pSHAG-1. The plasmids obtained were named pSHAG-482 and pSHAG-664, respectively.

Plasmid DNA was prepared using Endo-Free (Sigma) or Macherey–Nagel (Düren, Germany) Maxi Prep kit and contained no detectable bacterial genomic DNA or RNA contamination by DNA gel electro-

phoresis. Plasmid DNA preparations had less than 20% open circular or linear DNA.

**Cell culture.** For *in vitro* assays, the human hepatoma cell line Huh-7 was maintained in DMEM supplemented with 5 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, and 10% fetal bovine serum. Cells were transfected at 30–50% confluence using PEI in 10-cm diameter plates.

**Animal care and treatment.** Male ICR (CD1) mice purchased from Harlan Interfarma IBERICA S.L. (Spain) were maintained under a constant 12-h light–dark cycle and fed a standard rodent chow and water *ad libitum*. All animal protocols were approved by the Ethics Committee at the University of Barcelona.

Mice weighing 22–25 g were made diabetic with a single ip injection of 200 mg/kg streptozotocin in 100 mM citric/citrate buffer, pH 4.5. One week later, glycemia was assessed after a 6-h fast. Only those mice that had concentrations of blood glucose over 400 mg/dl were used in this study.

Hydrodynamic gene transfer was as described by Liu *et al.* [22]. Only 5 of 35 animals injected with shRNA-664 did not respond to hydrodynamic gene delivery in terms of decreased postinjection glycemia, probably due to the variability intrinsic to this procedure [22] and to noted problems during injection. Therefore, only those animals that responded to the injection were subsequently analyzed.

3-MPA was injected into diabetic animals as described elsewhere [44]. Briefly, 3-MPA was administered in a 1% (w/v) starch suspension to 2-h fasted mice. An initial dose of 100 mg/kg, followed 3 h later by a second dose of 25 mg/kg, was administered by intraperitoneal injection. Blood glucose was analyzed 5 h later.

Galactosamine/LPS has been shown to produce extensive hepatocellular apoptosis in mice [45] and was used as a positive control. Control mice (20–25 g) were injected ip with 700 mg/kg galactosamine and 100 mg/kg LPS in 200  $\mu$ l of saline. Negative control animals were injected with an equivalent volume of saline. Animals were killed 6 h after.

Animals were killed after ketamine–xylazine anesthesia or CO<sub>2</sub> inhalation, and liver and kidney were dissected and snap frozen in liquid nitrogen. Tissues were stored at –80°C until analysis. Blood was taken by heart puncture and serum was obtained by centrifugation at 2500 rpm at 4°C for 15 min.

**Confocal microscopy.** Four percent buffered paraformaldehyde-fixed tissue was cut into 50- $\mu$ m sections using a Leica VT M1000 slicing blade microtome. GFP was detected in sections using a spectral confocal microscope (Leica TCS-SL). PEPCK-C was immunostained using indirect immunofluorescence with a sheep anti-PEPCK-C primary antibody (kindly provided by Dr. Daryl Granner, Vanderbilt University) at a 1:1000 dilution followed by a donkey (1:200 dilution) anti-sheep antibody conjugated to Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Europe BV, Leiden, The Netherlands).

**Enzyme activity assays.** Liver extracts were obtained using a Polytron in appropriate lysis buffer. PEPCK activity was measured spectrophotometrically by coupling the conversion of phosphoenolpyruvate to oxaloacetate by PEPCK to the subsequent conversion to malate by malate dehydrogenase as described previously [46]. Activity was expressed as mUnits/mg protein in the supernatant. Caspase 3 activity assay was performed using a fluorometric assay essentially as described [47].

**Western blot.** Western blot was performed with 50  $\mu$ g of cell protein extract from cultured cells or 20  $\mu$ g from liver or kidney extracts in RIPA buffer. Proteins were separated in 10% SDS–PAGE and transferred to an Immobilon membrane (Millipore Corp., Bedford, MA, USA).

Sheep anti-PEPCK-C antiserum was used at a 1:20,000 dilution. Antibodies against eIF2 $\alpha$ -P Ser51 (Oncogene Research Products, San Diego, CA, USA) and ACC-P (Ser79) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) were used at a 1:1000 dilution. FAS antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was used at 1:500. All membranes were normalized using monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (1:4000) (Sigma) or anti-MAPK (1:2000) antibodies (New England Biolabs, Inc., Hitchin, UK).

**RNA isolation and Northern blot.** Total RNA was isolated using Ultraspec RNA (Biotech, Houston, TX, USA). The PEPCK-C probe used was a *Bam*HI–*Bgl*III fragment (1.5 kb) from the rat cDNA. Loading differences were normalized using a GAPDH-specific probe.

**Analytical procedures.** Blood glucose levels were measured using a Gluocacc Memory 2 apparatus (A. Menarini, Inc., Florence, Italy). Blood was collected from the tail tip. Unless indicated otherwise, animals were fasted for 8 h prior to blood and specimen collection.

The concentration of FFA in serum was measured using a NEFA C kit (Wako, Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). Serum triglycerides, lactate, and  $\beta$ -hydroxybutyrate were quantified using a colorimetric kits (Sigma). Some measurements of metabolites were performed by the Clinical Biochemistry Service from the Veterinary Hospital in Bellaterra, Spain. Serum insulin and IL-12 were determined using mouse insulin (healthy animals) and ultrasensitive mouse insulin (diabetic animals) ELISAs (Mercodia AB, Uppsala, Sweden) and a mouse IL-12 ELISA (Bender MedSystems, San Bruno, CA, USA), respectively.

To determine hepatic glycogen content, livers were homogenized in 400 mM acetic/acetate buffer, pH 4.8, and boiled for 15 min. The homogenates were centrifuged for 5 min at 6000g. The supernatant was digested with 1 unit of  $\alpha$ -amiloglucosidase from *Leuconostoc* (Sigma) and the glucose produced was quantified using a glucose oxidase kit (Sigma). The hepatic TAG content was quantified using a TAG kit (Sigma) from 3 M KOH, 65% ethanol extracts based on the method of Salmon and Flatt for liver saponification.

LDH activity was measured from liver extracts (50 mM Tris, 0.1% Triton X-100, 2.5 mM DTT) using a LDH kit (Roche, Indianapolis, IN, USA).

Transaminase (GPT) levels in serum were quantified using a Reflotron system (Roche).

**Statistics.** Results are expressed as the means  $\pm$  standard error. Statistical analysis was always performed by one-way analysis of variance and Student's *t* test. A *P* < 0.05 was considered significant.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Dr. Richard W. Hanson for helpful discussions and reviewing the manuscript. A. G. Gómez-Valadés and A. Vidal-Alabré were supported by fellowships awarded from F.P.U., the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain), and F.I., DURSI, Generalitat de Catalunya, respectively. This study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) (SAF02-02964 and BF103-02539) and the Fundació Marató de TV3 (031633). We also thank the Research Support Services from the Biology Unit of Bellvitge, University of Barcelona, for their technical assistance.

RECEIVED FOR PUBLICATION MARCH 10, 2005; REVISED AUGUST 31, 2005; ACCEPTED AUGUST 31, 2005.

## REFERENCES

- Landau, B. R., Wahren, J., Chandramouli, V., Schumann, W. C., Ekberg, K., and Kalhan, S. C. (1996). Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J. Clin. Invest.* **98**: 378–385.
- Katz, J., and Tayek, J. A. (1998). Gluconeogenesis and the Cori cycle in 12-, 20-, and 40-h-fasted humans. *Am. J. Physiol.* **275**: E537–E542.
- She, P., Shiota, M., Shelton, K. D., Chalkley, R., Postic, C., and Magnuson, M. A. (2000). Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 6508–6517.
- Curthoys, N. P., and Gstraunthaler, G. (2001). Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **281**: F381–F390.
- Owen, O. E., Kalhan, S. C., and Hanson, R. W. (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J. Biol. Chem.* **277**: 30409–30412.
- Hanson, R. W., and Reshef, L. (2003). Gluconeogenesis revisited. *Biochimie* **85**: 1199–1205.
- Crosset, M., Rajas, F., Zitoun, C., Hurot, J. M., Montano, S., and Mithieux, G. (2001). Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* **50**: 740–746.
- DeFronzo, R. A., and Ferrannini, E. (1991). Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* **14**: 173–194.
- Consoli, A., Nurjhan, N., Capani, F., and Gerich, J. (1989). Predominant role of

- gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes* **38**: 550–557.
10. Hanson, R. W., and Reshef, L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 581–611.
  11. Bailey, C. J. (1992). Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care* **15**: 755–772.
  12. Goldstein, B. J. (2000). Rosiglitazone. *Int. J. Clin. Pract.* **54**: 333–337.
  13. Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2000). Thiazolidinediones: an update. *Lancet* **355**: 1008–1010.
  14. Hundal, R. S., et al. (2000). Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* **49**: 2063–2069.
  15. Zhou, G., et al. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* **108**: 1167–1174.
  16. Lefebvre, A. M., et al. (1998). Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat. Med.* **4**: 1053–1057.
  17. Sarraf, P., et al. (1998). Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat. Med.* **4**: 1046–1052.
  18. Saez, E., et al. (1998). Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat. Med.* **4**: 1058–1061.
  19. Stumvoll, M., Nurihan, N., Perriello, G., Dailey, G., and Gerich, J. E. (1995). Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **333**: 550–554.
  20. Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., and Conklin, D. S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* **16**: 948–958.
  21. McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J., and Kay, M. A. (2002). RNA interference in adult mice. *Nature* **418**: 38–39.
  22. Liu, F., Song, Y., and Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* **6**: 1258–1266.
  23. Zhang, G., Budker, V., and Wolff, J. A. (1999). High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* **10**: 1735–1737.
  24. Kobayashi, N., et al. (2004). Vector-based in vivo RNA interference: dose- and time-dependent suppression of transgene expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**: 688–693.
  25. Ruijter, J. M., Gieling, R. G., Markman, M. M., Hagoort, J., and Lamers, W. H. (2004). Stereological measurement of porto-central gradients in gene expression in mouse liver. *Hepatology* **39**: 343–352.
  26. Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H., and Williams, B. R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.* **5**: 834–839.
  27. Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducaux, A., Nicoulaz, A. L., and Iggo, R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Genet.* **34**: 263–264.
  28. Pruetz, S. B., Fan, R., and Zheng, Q. (2003). Acute ethanol administration profoundly alters poly I:C-induced cytokine expression in mice by a mechanism that is not dependent on corticosterone. *Life Sci.* **72**: 1825–1839.
  29. Martin, E. J., and Forkert, P. G. (2004). Evidence that 1,1-dichloroethylene induces apoptotic cell death in murine liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**: 33–42.
  30. Korytkowski, M. T. (2004). Sulfonylurea treatment of type 2 diabetes mellitus: focus on glimepiride. *Pharmacotherapy* **24**: 606–620.
  31. Miyazaki, Y., et al. (2001). Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in Type II diabetic patients. *Diabetologia* **44**: 2210–2219.
  32. Kirpichnikov, D., McFarlane, S. I., and Sowers, J. R. (2002). Metformin: an update. *Ann. Intern. Med.* **137**: 25–33.
  33. Valera, A., Pujol, A., Pelegrin, M., and Bosch, F. (1994). Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9151–9154.
  34. Sun, Y., et al. (2002). Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **277**: 23301–23307.
  35. Beale, E. G., Hammer, R. E., Antoine, B., and Forest, C. (2004). Dysregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene. *Trends Endocrinol. Metab.* **15**: 129–135.
  36. Jomain-Baum, M., Schramm, V. L., and Hanson, R. W. (1976). Mechanism of 3-mercaptopyruvate inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *J. Biol. Chem.* **251**: 37–44.
  37. Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T., and Uyeda, K. (2002). Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **277**: 3829–3835.
  38. Matsuzaka, T., et al. (2004). Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes* **53**: 560–569.
  39. Zeini, M., et al. (2005). Assessment of a dual regulatory role for NO in liver regeneration after partial hepatectomy: protection against apoptosis and retardation of hepatocyte proliferation. *FASEB J.* **19**: 995–997.
  40. Jungermann, K., and Kietzmann, T. (1996). Zonation of parenchymal and non-parenchymal metabolism in liver. *Annu. Rev. Nutr.* **16**: 179–203.
  41. Reshef, L., et al. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* **278**: 30413–30416.
  42. Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**: 193–199.
  43. Paddison, P. J., Caudy, A. A., and Hannon, G. J. (2002). Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 1443–1448.
  44. Simon, C., Herling, A. W., Preibisch, G., and Burger, H. J. (2000). Upregulation of hepatic glucose 6-phosphatase gene expression in rats treated with an inhibitor of glucose-6-phosphate translocase. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**: 418–428.
  45. Gujral, J. S., Knight, T. R., Farhood, A., Bajt, M. L., and Jaeschke, H. (2002). Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol. Sci.* **67**: 322–328.
  46. Petrescu, I., Bojan, O., Saied, M., Barzu, O., Schmidt, F., and Kuhnle, H. F. (1979). Determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity with deoxyguanosine 5'-diphosphate as nucleotide substrate. *Anal. Biochem.* **96**: 279–281.
  47. Herrera, B., et al. (2001). Activation of caspases occurs downstream from radical oxygen species production, Bcl-xL down-regulation, and early cytochrome C release in apoptosis induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes. *Hepatology* **34**: 548–556.

# *Pck1* Gene Silencing in the Liver Improves Glycemia Control, Insulin Sensitivity, and Dislipidemia in *db/db* Mice

Alicia G. Gómez-Valadés,<sup>1</sup> Andrés Méndez-Lucas,<sup>1</sup> Anna Vidal-Alabró,<sup>1</sup> F.X. Blasco,<sup>1</sup> M. Chillon,<sup>2</sup> R. Bartrons,<sup>1</sup> J. Bermúdez,<sup>1</sup> and José C. Perales<sup>1</sup>

**AQ: B** **OBJECTIVE**—Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C; encoded by *Pck1*) catalyzes the first committed step in gluconeogenesis. Extensive evidence demonstrates a direct correlation between PEPCK-C activity and glycemia control. Therefore, we aimed to evaluate the metabolic impact of and their underlying mechanisms of knocking down hepatic PEPCK-C in a type 2 diabetic model.

**AQ: D** **RESEARCH DESIGN AND METHODS**—PEPCK-C gene targeting was achieved using adenovirus-transduced RNAi. The study assessed several clinical symptoms of diabetes and insulin signaling in peripheral tissues, in addition to changes in gene expression, protein, and metabolites in the liver. Liver bioenergetics was also evaluated.

**RESULTS**—Treatment resulted in reduced PEPCK-C mRNA and protein. After treatment, improved glycemia and insulinemia, lower triglyceride, and higher total and HDL cholesterol were measured. Unsterilized fatty acid accumulation was observed in the liver, in the absence of de novo lipogenesis. Despite hepatic lipidosis, treatment resulted in improved insulin signaling in the liver, muscle, and adipose tissue. O<sub>2</sub> consumption measurements in isolated hepatocytes demonstrated unaltered mitochondrial function and a consequent increased cellular energy charge. Key regulatory factors (FOXO1, hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ , and PGC-1 $\alpha$ ) and enzymes (G6Pase) implicated in gluconeogenesis were downregulated after treatment. Finally, the levels of Sirt1, a redox-state sensor that modulates gluconeogenesis through PGC-1 $\alpha$ , were diminished.

**CONCLUSIONS**—Our observations indicate that silencing PEPCK-C has direct impact on glycemia control and energy metabolism and provides new insights into the potential significance of the enzyme as a therapeutic target for the treatment of diabetes. *Diabetes* 57:1–12, 2008

**T**he liver has a central role in maintaining glucose and energy homeostasis. Postabsorptive metabolism in hepatocytes ensures glucose synthesis via gluconeogenesis and glycogenolysis to maintain blood glucose levels. In diabetic patients, sustained

rates of gluconeogenesis independent of nutrient status are responsible for increased hepatic glucose output (HGO) and, therefore, hyperglycemia (1,2).

Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) catalyzes the first committed step in gluconeogenesis. Gene transcription from the cytosolic form of PEPCK (PEPCK-C) is highly regulated by the glucagon/insulin axis. During diabetes, the lack of insulin (type 1 diabetes) or resistance to its action (type 2 diabetes) is responsible for an important upregulation of the enzyme, and this induction correlates with increased rates of gluconeogenesis in liver and kidney (3). Also, PEPCK gene modulation in the liver has resulted in remarkable effects on systemic glucose metabolism in mice. A twofold overexpression of PEPCK-C results in insulin resistance (4), whereas a sevenfold overexpression results in hyperglycemia (5). Moreover, studies by Burgess et al. (6) and She et al. (7,8) using a liver-specific PEPCK-C knockout mouse have shed light on the critical role of PEPCK-C in the integration of energy metabolism through a mechanism that implicates cataplerosis from mitochondria, as highlighted by hypoglycemia and lethality after ablation of PEPCK-C gene in mice (7–9). Furthermore, a polymorphism in the promoter for *Pck1* is associated with the development of type 2 diabetes (10) and dysregulation of gluconeogenesis has direct implications for glucose homeostasis in humans (2,11).

Despite all evidence, the validation of this enzyme as a target for liver-specific gene therapy or pharmacological intervention in diabetes has not been extensively investigated to date. Prior studies in streptozotocin-treated mice using RNAi-directed downregulation of PEPCK-C in the liver have shown a direct role for this enzyme in the regulation of glucose homeostasis in the absence of insulin (12). Here, we have focused on evaluating the indirect metabolic impact of knocking down hepatic PEPCK-C in a model of insulin resistance.

We show that partial silencing of hepatic PEPCK-C in *db/db* mice leads to improved glycemia control directly, through the coordinate inhibition of components of the gluconeogenic pathway in the liver, and indirectly, by improving insulinemia and peripheral sensitivity to the hormone. Our observations indicate that PEPCK-C plays a key role in the control of hepatic energy metabolism and provides a novel therapeutic approach for the treatment of diabetes.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

**Experimental animals and adenovirus.** Male C57BKS.Cg-+Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup> (*db/db*) mice were purchased from Harlan Interfarma, maintained in a constant 12-h light/dark cycle, and fed a standard rodent chow and water ad libitum. At the beginning of the experiment, animals were 6–8 weeks old. All

From the <sup>1</sup>Biophysics Unit, Department of Physiological Sciences II, IDIBELL—University of Barcelona, L'Hospitalet del Llobregat, Spain; and the <sup>2</sup>Center of Animal Biotechnology and Gene Therapy, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

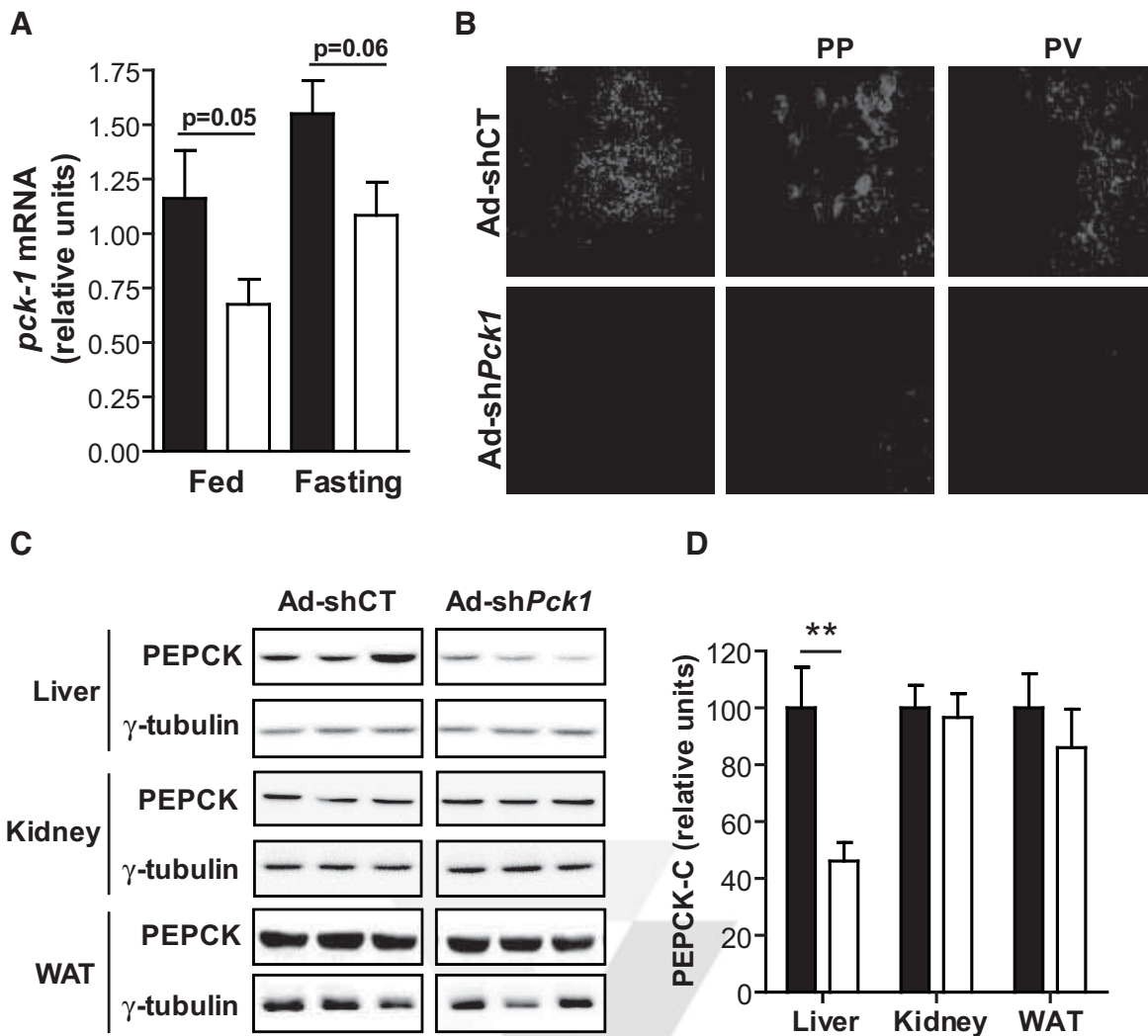
Corresponding author: Dr. José C. Perales, jperales@ub.edu.

Received 20 September 2007 and accepted 20 April 2008.

Published ahead of print at <http://diabetes.diabetesjournals.org> on 28 April 2008. DOI: 10.2337/db07-1087.

© 2008 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.



**FIG. 1.** Adenovirus-mediated shRNA knocks down PEPCK-C specifically in the liver. A dose of  $6.67 \times 10^{10}$  pfu/kg control (Ad-shCT) and PEPCK-C-directed shRNA (Ad-shPck1) adenovirus was injected in male, 6- to 8-week-old *db/db* mice. **A:** PEPCK-C expression analyzed by quantitative RT-PCR in fed ( $n = 11$ ) or overnight-fasted ( $n = 5$ ) animals 14 days after treatment.  $\beta$ -2-microglobulin was used as housekeeping gene. Data are represented as relative *Pck1* gene expression compared with control-fed animals (Ad-shCT). Data are means  $\pm$  SE. Student's *t* test was used to discriminate statistical significance. **B:** PEPCK-C immunohistochemistry was performed in 7- $\mu$ m cryosections obtained from livers treated with either control or PEPCK-C-targeted shRNA. Confocal microscopy was used to determine signal distribution throughout the liver acinus.  $\times 100$  (right) and  $\times 400$  image magnification blow up from periportal (PP) and perivenous (PV) zones are shown. Pictures are representative of three independent experiments. **C:** PEPCK-C immunodetection in total protein extracts from liver, kidney, and epididymal WAT.  $\gamma$ -Tubulin was used to normalize protein loading. Representative blots from three independent experiments are shown. **D:** Densitometric quantification of liver ( $n = 11$ ), kidney ( $n = 4$ ), and WAT ( $n = 4$ ) blots shown in C. ■, Ad-shCT; □, Ad-shPck1 group. Data are means  $\pm$  SE; \*\**P* < 0.01, Student's *t* test.

animal protocols were approved by the Ethics Committee at the University of Barcelona.

**AQ: E** Recombinant E1-E3 deficient adenovirus (serotype 5) encoding shRNA against PEPCK-C (Ad-shPck1) and *Phothinus pyralis* luciferase (Ad-shCT) (used as unspecific control sequence) were generated in the Viral Production Unit of the Center of Animal Biotechnology and Gene Therapy (UPV-CBATEG) (Bellaterra, Spain).

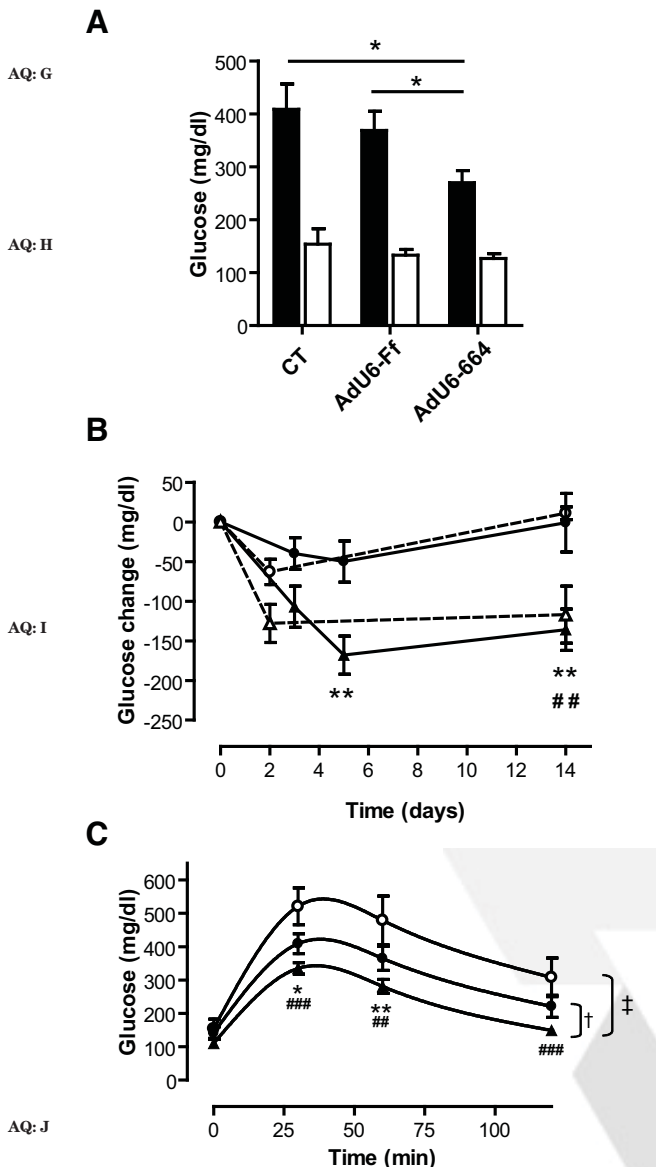
Adenovirus was administered by tail vein injection of  $6.67 \times 10^{10}$  plaque-forming units (pfu)/kg in 200  $\mu$ l physiological saline. Fed blood glucose and weight were measured at 8:00 A.M. Surgery was performed under isoflurane anesthesia (Abbot). Tissues were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Blood was collected by inferior cava puncture.

**Peripheral insulin sensitivity.** Overnight fasted mice were anesthetized, and gastrocnemius muscle, epididymal fat, and liver samples were taken at time 0 and 5 min after a 10-IU/kg insulin bolus was injected via tail vein.

**Glucose and insulin tolerance tests.** Glucose tolerance was assayed 7 days after treatment in 32-h-fasted mice after a 1-g/kg glucose bolus intraperitoneal injection. Insulin tolerance was determined in mice fed ad libitum, after intraperitoneal injection of 2 IU/kg bovine insulin (Sigma) at day 8 after treatment. Blood glucose was measured at the indicated time points after challenge.

**Glucose production from pyruvate.** A 2 g/kg buffered pyruvate (Sigma) bolus was injected intraperitoneally in 32-h-fasted mice, on day 7 after adenoviral infection. Glucose levels were measured at indicated time points.

**RNA extraction and quantitative RT-PCR.** Total RNA was extracted using RNeasy mini kit (Qiagen). cDNA synthesis from 2  $\mu$ g RNA was performed using Ready-To-Go You-Prime First Strand Beads (Amersham Biosciences) with random hexamers. mRNA levels of selected genes were quantified using a Low Density Array (Applied Biosystems) in a HT7900 Real-Time RT-PCR system (Applied Biosystems). Gene expression was normalized with  $\beta$ -2-



**FIG. 2.** Knocking down hepatic PEPCK-C in diabetic *db/db* mice leads to improved glucose homeostasis. **A:** Fed glycemia (■) was assessed 14 days after treatment with saline (CT;  $n = 5$ ), with adenovirus expressing a nonspecific shRNA (Ad-shCT;  $n = 19$ ), or with a PEPCK-C specific shRNA (Ad-shPck1;  $n = 19$ ). Fasting glycemia was measured after a 32-h fast on day 7 after infection (□) in the same animals. Data are means  $\pm$  SE; \* $P < 0.05$ , Student's *t* test. **B:** Fed glycemia relative to glycemia before treatment. Fed glycemia was scored in CT group ( $n = 5$ ; ○), Ad-shCT ( $n = 19$ ; ●), and Ad-shPck1 ( $n = 19$ ; ▲) before treatment and over the duration of the experiment. An additional experimental group was treated orally with metformin (MET) ( $n = 5$ ; △). Metformin was added to drinking water to achieve a daily dose of  $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  in view of the daily water consumption. Average daily water consumption was calculated every day for 1 week before initialization of experiment. Water consumption and metformin dosage was recalculated twice a week and corrected, if necessary, to adjust dosage. Data are means  $\pm$  SE; \* $P < 0.01$  Ad-shPck1 vs. Ad-shCT; and \*\* $P < 0.01$  MET vs. CT, Student's *t* test. **C:** Seven days after adenoviral infection, an intraperitoneal glucose tolerance test was performed in 32-h-fasted mice as described in RESEARCH DESIGN AND METHODS, and glucose was measured at the indicated time points in CT ( $n = 5$ ), Ad-shCT ( $n = 13$ ), and Ad-shPck1 ( $n = 12$ ) groups. \* $P < 0.05$

microglobulin as a housekeeping gene. Data analysis is based on the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method.

**Western blot.** Tissue was homogenized in radioimmunoprecipitation assay buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors and centrifuged at  $15,000 \times g$  for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . Western blots were performed with 20–50  $\mu\text{g}$  tissue extract. Proteins were separated in 8–12% SDS-PAGE and transferred to an Immobilon membrane (Millipore). Nuclear extracts were obtained as described previously (13).

Sheep anti-PEPCK-C antiserum (a gift from Dr. Granner, Vanderbilt University, Nashville, TN) was used at a 1:20,000 dilution; antibodies against acetyl-CoA carboxylase (ACC) and ACC-P (Ser<sup>79</sup>) (Upstate) were used at 1:2,000; and antibodies against AMPK, AMPK-P (Thr<sup>172</sup>), AKT, AKT-P (Thr<sup>308</sup>), AKT-P (Ser<sup>473</sup>) (Cell Signaling), Sirt1 (Upstate), and sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c; Santa Cruz Biotechnology) were used at 1:1,000. VDAC antibody (provided by Dr. Pujol, IDIBELL) was diluted 1:1,000. FAS and protein kinase C  $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) antibodies (Santa Cruz Biotechnology) were used at 1:500 dilution. FOXO1 (Santa Cruz Biotechnology), FOXO1-P (Ser<sup>256</sup>) (Cell Signaling), and PGC-1 (Cell Signaling) were used at 1:250. All membranes were normalized using monoclonal anti- $\gamma$ -tubulin (Sigma) at 1:10,000. Horseradish peroxidase activity linked to secondary antibody was detected with ECL substrate (Pierce) in a Fujifilm LAS 3000 Intelligent Dark Box IV imaging system. Densitometry was performed using Multi Gauge software.

PKC $\epsilon$  activity was estimated as the ratio of membrane to cytosol PKC $\epsilon$  signal. To separate membrane and cytosolic fractions, liver homogenates were centrifuged at  $800 \times g$  for 10 min, and supernatants were further centrifuged at  $100,000 \times g$  for 45 min. Enrichment was assessed after blotting the membranes with antibodies (1:1,000) against cytosolic (pyruvate kinase [L-PK]; gift from Dr. Bartons, University of Barcelona) and membrane-associated (EGFR, gift of Dr. Rosa, University of Barcelona) proteins.

**Histology and immunofluorescence.** A portion of the third hepatic lobe was fixed for at least 24 h in 4% paraformaldehyde, equilibrated in 30% saccharose, embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura), and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until 7- $\mu\text{m}$ -thick cryosections were obtained. Oil red lipid staining and PEPCK-C immunostaining were previously described (12).

**Blood and liver biochemical analysis.** Blood glucose was measured using a Glucocard Memory 2 apparatus (Menarini) by tail clipping. Serum metabolites were measured in the Veterinarian Clinical Biochemistry Service, Veterinary Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, Spain). Serum insulin was determined using Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA (Merckodia). HDL cholesterol was quantified using a Reflotron system (Roche Diagnostics).

Hepatic glycogen was measured essentially as previously described (9). Hepatic triglycerides and fatty acid content were quantified using a TAG kit (Sigma) and NEFA kit (Wako), respectively, in 3 mol/l KOH, 65% ethanol extracts, based on the method of Salmon and Flatt for liver saponification. Hepatic short chain acyl-CoAs (acetyl-CoA, malonyl-CoA, propionyl-CoA, and succinyl-CoA) were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described previously (14) in the Research Support Services from the University of Barcelona. Nucleotides (ATP/ADP/AMP) were determined in neutralized 10% perchloric acid extracts by HPLC.

**High-resolution respirometry.**  $\text{O}_2$  consumption was measured using a high-resolution Oxygraph respirometer (Oroboros, Innsbruck, Austria) in isolated hepatocytes. Briefly, liver was preperfused with calcium-free Hanks' balanced salt solution (HBSS) buffer (Sigma) at  $37^\circ\text{C}$  before perfusion with  $\text{Ca}^{2+}$ -containing HBSS and 3.5 mg/ml Liberase Blendzyme (Roche). Hepatocytes were cleared by repeated centrifugation at  $50 \times g$  for 5 min, and viability (>80%) was assessed by trypan blue exclusion. The respiration medium consisted of F-12 Coon's modification supplemented with 20 mmol/l HEPES, 20 mmol/l lactate, 2 mmol/l pyruvate, 2 mmol/l glutamine, and 1 mmol/l octanoate conjugated with 0.5% BSA. Medium was equilibrated with air at  $37^\circ\text{C}$  and stirred at 750 rpm until a stable signal was obtained for calibration at air saturation. At least  $10^6$  hepatocytes per milliliter were used for measurements. The titration protocol, which was completed within 50–60 min, was recorded at 2-s intervals using a computer-driven data acquisition system (Datlab; Oroboros).

**Statistical analysis.** Results are expressed as the means  $\pm$  SE. Statistical analysis was always performed by one-way or two-way ANOVA and two-tailed Student's *t* test. A  $P < 0.05$  was considered significant.

Ad-shPck1 vs. Ad-shCT; \*\* $P < 0.01$ ; and \*\*\* $P < 0.001$  Ad-shPck1 vs. CT, Student's *t* test. A two-way ANOVA did not detect significant differences between the CT and Ad-shCT groups but demonstrated statistically significant changes when comparing the Ad-shPck1 versus CT ( $\ddagger P < 0.001$ ) and versus Ad-shCT ( $\dagger P < 0.05$ ) treatment groups. Data are means  $\pm$  SE.

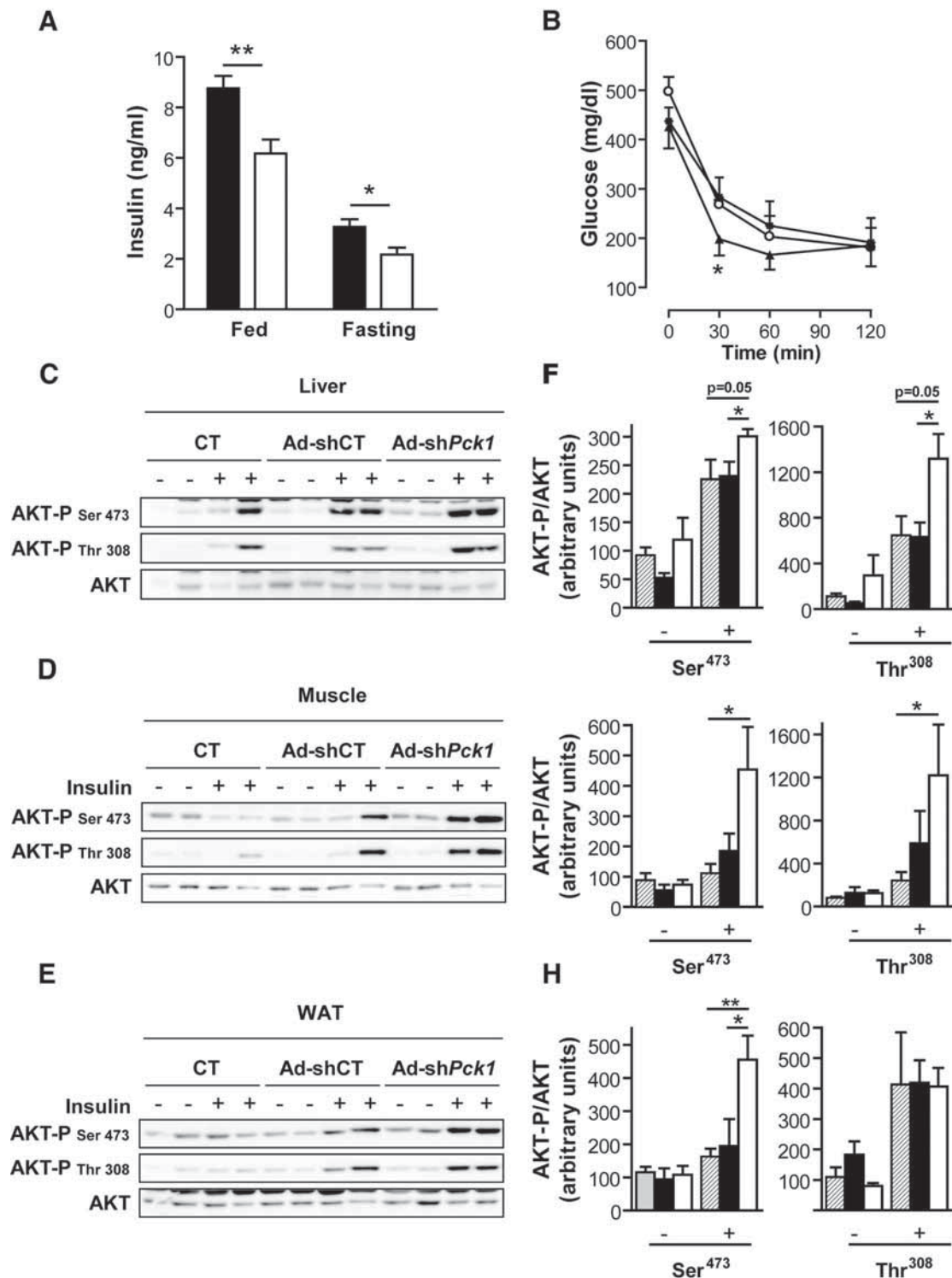


FIG. 3. Improved insulin sensitivity in hepatic PEPCK-C-silenced animals. **A**: Plasma insulin levels were assessed in fed mice 14 days after infection (Ad-shCT,  $n = 5$ ; Ad-shPck1,  $n = 4$ ;  $**P < 0.01$ , Student's  $t$  test) or in 32-h-fasted mice 7 days after infection (Ad-shCT,  $n = 13$ ; Ad-shPck1,  $n = 12$ ;  $*P < 0.05$ , Student's  $t$  test). ■, Ad-shCT; □, Ad-shPck1 group. **B**: For IPITT, a 2-IU/kg insulin bolus was injected into awake fed mice. Blood glucose levels were determined at the indicated time points after insulin bolus (CT, ○,  $n = 5$ ; Ad-shCT, ●,  $n = 8$ ; Ad-shPck1, ▲,  $n = 9$ ). Data are



**RESULTS**

**Liver-specific PEPCK-C gene silencing.** A previously validated shRNA sequence against PEPCK-C (12) was engineered into an adenovirus vector (Ad-sh*Pck1*) and tested for relative silencing efficiency compared with a control sequence (Ad-shCT). Treatment with Ad-sh*Pck1* achieved a 42 and 25% reduction in *Pck1* gene expression in fed and fasted livers, respectively (Fig. 1A). Interestingly, the net amount of RNA silenced was similar, independent of nutritional status. Densitometric quantification of Western blots confirmed a similar amount of hepatic PEPCK-C protein reduction on treatment ( $100 \pm 15.1$  vs.  $46.1 \pm 6.8$  relative units;  $n = 11$ ,  $P < 0.01$ ) (Fig. 1C and D). Because PEPCK-C is also present in kidney and adipose tissue, we assessed the tissue specificity of silencing. No changes in PEPCK-C protein content were observed either in kidney or epididymal adipose tissue (Fig. 1C and D). Finally, immunohistochemical analysis of PEPCK-C demonstrates a nonhomogeneous reduction of PEPCK-C immunoreactivity; more evident in pericentral than periportal hepatocytes (Fig. 1B).

**Whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity.** To investigate the consequences of PEPCK-C silencing on glycemia control, key metabolic parameters were measured. Fed blood glucose was significantly reduced in Ad-sh*Pck1* animals ( $271 \pm 23$  mg/dl) compared with both saline-treated ( $409 \pm 48$  mg/dl) and Ad-shCT-treated ( $370 \pm 38$  mg/dl) groups, although no significant changes were found in fasted animals (Fig. 2A). Interestingly, PEPCK-C silencing and oral metformin treatment demonstrated similar variations in fed glycemia (Fig. 2B).

Systemic glucose clearance, assessed using a glucose tolerance test, was improved after Ad-sh*Pck1* treatment, as demonstrated by a reduction in the area under the curve of  $\sim 40$  and 20% compared with saline-treated and Ad-shCT groups, respectively (Fig. 2C). Also, fed and fasting insulinemia were significantly reduced after treatment with Ad-sh*Pck1* (Fig. 3A). Accordingly, an intraperitoneal insulin tolerance test showed that PEPCK-C-silenced animals have higher sensitivity to insulin (Fig. 3B). Furthermore, Ad-sh*Pck1*-treated animals scored significantly lower ( $2.38 \pm 0.01$ ,  $n = 14$  vs.  $2.74 \pm 0.07$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 5$  and vs.  $2.53 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 14$ ; Ad-sh*Pck1* vs. saline treated and vs. Ad-shCT, respectively) when their degree of insulin resistance was assessed from the QUICKI index (15).

Next, we directly evaluated insulin signaling in vivo measuring insulin-stimulated AKT phosphorylation in liver, muscle, and epididymal adipose tissue (white adipose tissue [WAT]). AKT phosphorylation at Ser<sup>473</sup> and Thr<sup>308</sup> was enhanced in Ad-sh*Pck1*-treated animals after insulin treatment, in marked contrast to reduced signaling by insulin in saline-treated and Ad-shCT-treated groups (Fig. 3C-H). These data demonstrate improved peripheral

means  $\pm$  SE, \* $P < 0.05$  (CT vs. Ad-sh*Pck1*) and  $P = 0.09$  (Ad-shCT vs. Ad-sh*Pck1*), Student's *t* test. Insulin signaling in liver (C and F), muscle (D and G), and epididymal fat depots (E and H) was assessed in overnight fasted mice 1 week after infection by means of an intravenous insulin bolus (10 IU/kg) as described in RESEARCH DESIGN AND METHODS. The level of AKT phosphorylation (at both Ser<sup>473</sup> and Thr<sup>308</sup> residues) and the total AKT protein content were detected by Western blot (C-E). Representative blots of two independent experiments are shown. Additionally, bands were quantified by densitometry (F-H). ■, saline-injected animals (CT); ■, Ad-shCT group; □, Ad-sh*Pck1* group. Bars represent the AKT-P-to-AKT ratio related to control (CT) group in the basal state. Data are means  $\pm$  SE of 4-6 animals per group. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , Student's *t* test.

F1

F2

F3

AQ: L

**TABLE 1**  
Metabolic profile of *db/db* mice after partial liver silencing of PEPCK-C

	Blood metabolites				Liver metabolites				
	FFA (mmol/l)	TAG (mg/dl)	$\beta$ -HBA (mmol/l)	GPT (units/l)	Total Cholesterol (mg/dl)	HDL Cholesterol (mg/dl)	Glycogen (mmol $\cdot$ l <sup>-1</sup> $\cdot$ g <sup>-1</sup> )	TAG (mg/g)	Fatty acids (mmol/g)
Fed	Ad-shCT Ad-sh <i>Pck1</i>	0.92 $\pm$ 0.05 0.78 $\pm$ 0.04	174.75 $\pm$ 12.61 117.83 $\pm$ 12.61*	0.22 $\pm$ 0.05 0.29 $\pm$ 0.04	144.00 $\pm$ 11.46 150.82 $\pm$ 4.99	60.86 $\pm$ 5.23 74.93 $\pm$ 4.75*	273.41 $\pm$ 31.34 296.74 $\pm$ 18.65	117.37 $\pm$ 15.20 173.39 $\pm$ 11.43†	0.48 $\pm$ 0.28 1.68 $\pm$ 0.45*
Fasted	Ad-shCT Ad-sh <i>Pck1</i>	0.89 $\pm$ 0.08 0.58 $\pm$ 0.02	134.50 $\pm$ 11.05 86.00 $\pm$ 7.14	0.40 $\pm$ 0.05 0.66 $\pm$ 0.08	104.85 $\pm$ 3.06 132.85 $\pm$ 2.07‡	ND ND	70.18 $\pm$ 3.33 19.41 $\pm$ 3.69§	43.94 $\pm$ 4.75 107.05 $\pm$ 11.24§	2.30 $\pm$ 0.21 4.01 $\pm$ 0.27§

Data are means  $\pm$  SE,  $n = 13$ -16 (Ad-shCT) and  $n = 15$ -18 (Ad-sh*Pck1*). \* $P < 0.05$ , † $P < 0.05$ , ‡ $P < 0.01$  vs. control virus treatment in fed experiments, unpaired Student's *t* test; § $n = 6$  (Ad-shCT and Ad-sh*Pck1*), ‡ $P < 0.01$ , § $P < 0.001$  vs. control virus treatment in fasting experiments; unpaired Student's *t* test. ND, nondetermined. Sera were obtained 14 days after adenoviral infection from fed or overnight-fasted mice.

insulin sensitivity after partial hepatic PEPCK-C knockdown in the *db/db* mouse model.

**Gluconeogenesis and HGO.** HGO, determined by the flux from pyruvate to glucose *in vivo*, was reduced in Ad-sh*Pck1*-treated animals (Fig. 4A). Moreover, liver glycogen was significantly reduced in Ad-sh*Pck1*-treated animals on fasting (Table 1), consistent with decreased hepatic glucose production capacity

Glucose-6-phosphatase catalyzes the last step in the gluconeogenic and glycogenolysis pathways, and is, therefore, responsible for regulating HGO. The mRNA of this enzyme (encoded by *G6pc*) was significantly reduced at levels comparable with those observed for PEPCK-C (encoded by *Pck1*). Glucose-6-phosphatase and PEPCK-C are regulated by transcription factors like hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ) (encoded by *Hnf4a*) and FOXO1, which are co-activated by PGC-1 $\alpha$  (encoded by *Pparg1a*). PGC-1 $\alpha$  mRNA was slightly reduced in PEPCK-C-silenced animals (Fig. 4B), although PGC-1 $\alpha$  protein in nuclear extracts was constant (Fig. 4C and D). HNF-4 $\alpha$  is down-regulated, albeit nonsignificantly, in treated animals. In addition, FOXO1 phosphorylation at Ser<sup>256</sup> increased in liver of Ad-sh*Pck1*-treated animals (Fig. 4E and F). These data suggest that insulin signaling through AKT-dependent FOXO1 phosphorylation contributes to the observed reduction in steady-state mRNA levels for gluconeogenic genes such as *G6pc* and *Pck1*.

**Lipid homeostasis.** To investigate the effects of liver-specific PEPCK-C knockdown on lipid metabolism, several blood and liver parameters were analyzed. Serum triglycerides were pronouncedly reduced both in fed and fasted animals after PEPCK-C silencing in the liver, accompanied by decreased serum free fatty acids (FFAs) and increased  $\beta$ -HBA. Furthermore, a net increase in total serum cholesterol with a concomitant increase in HDL cholesterol was found (Table 1).

Lipid accumulation in the liver is a characteristic of the diabetic phenotype in *db/db* mice. Oil red staining demonstrated both micro- and macrovesicular lipid droplets in Ad-shCT-treated livers, which are more profuse in Ad-sh*Pck1* group, especially in periportal compared with perivenous hepatocytes (Fig. 5A). Consistently, we observed a moderate increase in hepatic triacylglycerol (TAG) and a 3.5-fold increase in liver fatty acid content after PEPCK-C silencing (Fig. 5B). Meanwhile, the level of FAS mRNA was unaltered, whereas SREBP1-c and LXR- $\alpha$  decreased ~25% (Fig. 5C). Correspondingly, the precursor (p125) and active form (p68) of SREBP1-c were reduced, whereas FAS protein content was unchanged (Fig. 5D and E). Moreover, mRNA and protein levels from glycolytic and lipogenic enzymes, such as glucokinase (*Gck*), L-PK, or malic enzyme (*Mod1*), were unaltered or significantly reduced (Fig. 5C-E). ChREBP, which plays an important role in regulating glycolytic (L-PK) and lipogenic (ACC and FAS) genes, was unaltered (Fig. 5C-E), which supports the absence of *de novo* lipogenesis in livers of Ad-sh*Pck1*-treated mice.

Malonyl-CoA is an important contributor to the opposing regulation of fatty acid  $\beta$ -oxidation and fatty acid synthesis through its dual function as allosteric inhibitor of CPT-1 and FAS substrate (16). Although, a significant increase of malonyl-CoA content in liver was found (Table 2), ACC, the enzyme responsible for its synthesis, was not stimulated because the ratio of ACC-P to ACC was unchanged in the liver of PEPCK-C-silenced mice (Fig. 5F). These data further support the view that PEPCK-C

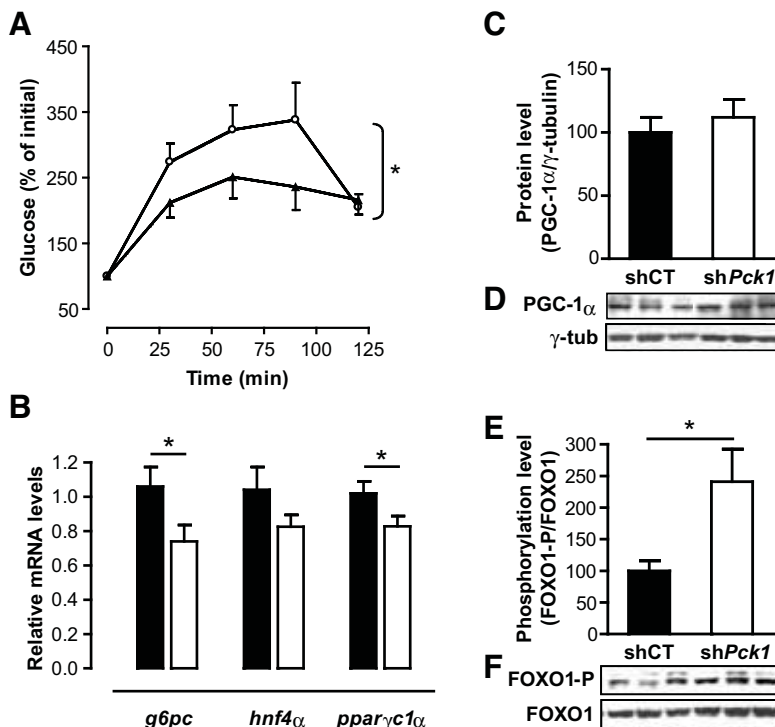
silencing in the liver of *db/db* mice does not induce *de novo* lipogenesis.

Interestingly, despite liver lipidosis (Fig. 5A and B), hepatic and peripheral insulin signaling was improved in PEPCK-C-silenced animals (Fig. 3). PKC $\epsilon$  plays a critical role in mediating fat-induced hepatic insulin resistance (17). No activation of PKC $\epsilon$  was observed after partial PEPCK-C knockdown in *db/db* livers (Fig. 5G and H), suggesting that lipid accumulation is dissociated from insulin resistance induction in our model.

**Modulation of energy metabolism.** Because impairment of the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) and mitochondrial function are hallmarks of liver-specific PEPCK-C knockout mice (6,8,9), we evaluated several parameters of mitochondrial function, including  $\beta$ -oxidation. The rate-limiting step in  $\beta$ -oxidation is the transport of acyl-CoA into the mitochondria catalyzed by the CPT-1 shuttle, whose mRNA content was slightly reduced (Fig. 6B). Consistently, the mRNA for PGC-1 $\alpha$ , a key player in the regulation of both  $\beta$ -oxidation and gluconeogenic pathways, was lowered after treatment (Fig. 4B). In contrast, a slight increase in serum ketones in both fed and fasted animals (Table 1), together with unchanged levels of HMG-CoA synthase mRNA (Fig. 6B) and a significant increase in propionyl-CoA, an odd chain  $\beta$ -oxidation intermediate (Table 2), suggests that  $\beta$ -oxidation was not markedly affected.

The mitochondrial respiration rate, determined in freshly isolated hepatocytes in the presence of octanoate, was unaffected by treatment with Ad-sh*Pck1*. Moreover, the maximum mitochondrial respiration capacity (uncoupler carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenyl-hydrazone [FCCP]) (Fig. 6A) and the content of the inner mitochondrial membrane ADP transporter, VDAC (Fig. 6C), a marker of the amount of respiratory chains and hence mitochondrial content, were unchanged, suggesting that partial PEPCK-C knockdown does not impair the TCA cycle and does not negatively affect mitochondrial biogenesis or limit mitochondrial oxidative capacity in excess of medium-chain fatty acid substrate. Consistently, no accumulation of TCA intermediates, like acetyl-CoA and succinyl-CoA, was observed (Table 2). Additionally, the expression profile of cytosolic (decreased) and mitochondrial (unaltered) superoxide dismutases (SODs) is compatible with increased peroxisomal oxidation activity (18) (Fig. 6D). The ratios estimated from respirometry data (respiratory control ratio [RCR], uncoupling control ratio [UCR], and phosphorylation RCR [RCRP]) were unaltered after Ad-sh*Pck1* treatment (Fig. 6A). In agreement with UCR index, the level of expression from the gene encoding the uncoupling protein two (*Ucp2*) was unchanged, suggesting that mitochondrial respiration was not uncoupled (Fig. 6B).

It is widely accepted that gluconeogenesis is dependent on fatty acid oxidation as an energy source. An imbalance between these two pathways would, theoretically, alter cellular energy charge (CEC), unless a corresponding energy producing or consuming pathway compensates for such disequilibrium. Our data show an apparent reduction in gluconeogenesis while  $\beta$ -oxidation is maintained. Consistently, CEC was greatly increased, because of a 25% reduction of AMP and a 50% increment in ATP content (Table 2). As a result, the master switch energy sensor AMPK (19), which is activated by decreasing energy charge, was not stimulated, as determined by the ratio of phosphorylated versus total AMPK (Fig. 6E), and ACC, a



**FIG. 4.** Coordinated downregulation of gluconeogenic genes and decreased hepatic glucose production capacity after hepatic PEPCK-C silencing. **A:** HGO was evaluated *in vivo* by assaying the glucose production from pyruvate as described in RESEARCH DESIGN AND METHODS. Hepatic PEPCK-C-silenced group reflected a significant reduction in glucose production capacity after a pyruvate bolus injection. Two-way ANOVA was used to discriminate treatment efficiency. Data are means  $\pm$  SE. Ad-shCT,  $\circ$ ,  $n = 9$ ; Ad-shPck1,  $\blacktriangle$ ,  $n = 9$ ; \* $P < 0.05$ . **B:** Expression of significant genes involved in gluconeogenesis (*G6pc*, *Hnf4 $\alpha$* , and *Pparg1 $\alpha$* ) was examined 2 weeks after treatment with Ad-shCT ( $n = 10$ ;  $\blacksquare$ ) or Ad-shPck1 ( $n = 11$ ;  $\square$ ) in fed animals. Gene expression was quantified using quantitative RT-PCR in an Applied Biosystems 7900HT Micro Fluidic Card. Data analysis was performed using the  $\Delta\Delta C_t$  method and  $\beta$ -2-microglobulin as housekeeping gene. Each value represents the mean relative amount of mRNA with respect to that in the control experimental treatment. Student's *t* test was used to determine statistical differences between treatments. \* $P < 0.05$ , Student's *t* test. **C:** Western blot immunodetection of PGC-1 $\alpha$  in hepatic nuclear extracts obtained from fed mice 14 days after treatment. Representative blots are shown. **D:** Densitometric quantification of PGC-1 $\alpha$  protein content in blots shown in **C** are represented as PGC-1 $\alpha$  content relative to  $\gamma$ -tubulin, which was used to normalize protein charge. Data are means  $\pm$  SE,  $n = 6$ . **E:** Phosphorylation level of FOXO-1 at the Ser<sup>256</sup> residue was analyzed by Western blot in total homogenates of livers from fed mice 14 days after treatment. Total FOXO-1 content was used to normalize phosphorylation level. **F:** Densitometric quantification of blots represented in **E**. Phosphorylation level is represented as FOXO-1-to-phospho-FOXO-1 Ser<sup>256</sup> ratio relative to control group.  $\blacksquare$ , Ad-shCT;  $\square$ , Ad-shPck1 group.  $n = 10$ , \* $P < 0.05$ , Student's *t* test.

target for AMPK, was not inhibited by phosphorylation (Fig. 5D).

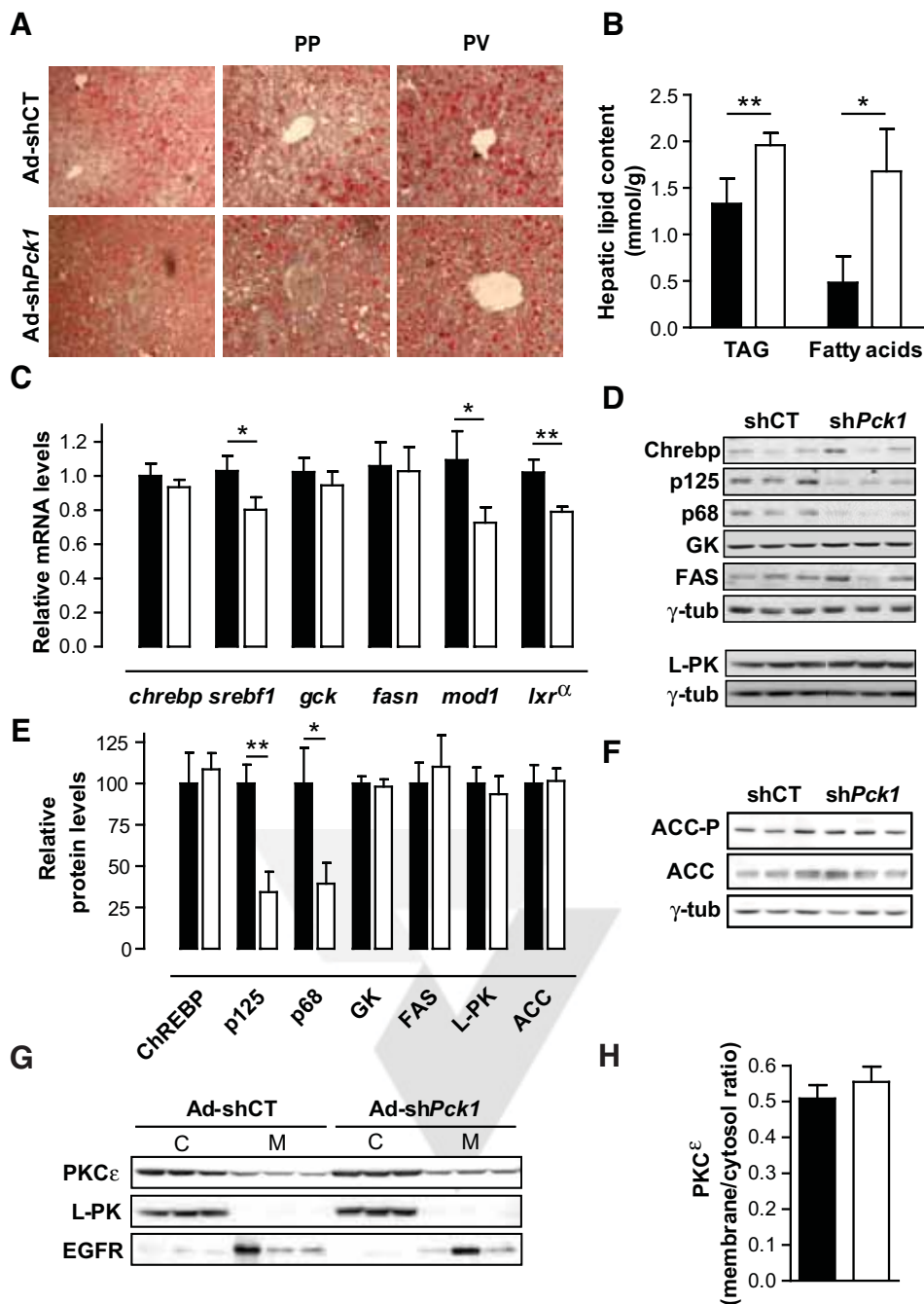
The work of Rodgers et al. (20) sheds some light on the regulation of gluconeogenesis in response to nutrients and changes in red-ox potential mediated by Sirt1, a NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase involved in PGC-1 $\alpha$  activation. Therefore, we evaluated the levels of Sirt1 to investigate whether the pathway could be responsible for the coordinated reduction in gluconeogenic enzymes and regulatory factors. A reduction of  $\sim 50\%$  ( $100 \pm 9.16$  vs.  $47.03 \pm 10.19$ ;  $n = 7$ ;  $P < 0.001$ ; Student's *t* test) in the levels of Sirt1 protein in the liver was observed (Fig. 6F–G).

## DISCUSSION

The natural tropism of adenovirus for the liver was used to obtain efficient, organ-specific delivery of a shRNA-producing expression vector against PEPCK-C. Infection of *db/db* mice with adenovirus-directed shRNA allowed inhibition of PEPCK-C specifically in the liver, with unaltered levels in kidney and WAT, where PEPCK-C have important roles in gluconeogenesis from glutamine and glyceroneogenesis, respectively (3).

Immunostaining experiments show a PEPCK-C gradient across the porto-central axis of the liver acinus (21). Silencing efficiency was higher in the perivenous portion of the acinus (Fig. 1C) where PEPCK-C levels are lower. Although similar silencing pattern and efficiency ( $\sim 50\%$ ) was obtained in our previous study on type 1 diabetes (12) using a hydrodynamic gene transfer technique, the present report demonstrates that the use of adenovirus can result in an absolute higher silencing efficiency (Supplementary Fig. 1, which is detailed in an online appendix [available at <http://dx.doi.org/10.2337/db07-1087>]) and longer lasting effects (up to 2 weeks), which allowed us to evaluate the metabolic impact and underlying mechanisms of knocking down hepatic PEPCK-C in a type 2 diabetic model.

Mice with reduced PEPCK-C liver content showed a clear improvement in glucose tolerance and fed glycemia, comparable with oral metformin. However, fasting glucose was unchanged, even though HGO from pyruvate was clearly reduced. Compensatory HGO from glycogenolysis, as supported by reduced hepatic glycogen content in fasting and even in fed animals when silencing reached 90% (Supplementary Fig. 1), could be responsible for



**FIG. 5.** Effect of hepatic PEPCK-C partial silencing on hepatic lipid homeostasis. **A:** Livers from fed mice 14 days after treatment were fixed in 4% paraformaldehyde, and oil red staining was performed in 7- $\mu$ m cryosections. **Right panel** shows a  $\times 100$  magnification liver section. A view of periportal (PP) and perivenous (PV) zones are shown with a  $\times 200$  magnification. Representative pictures from three independent experiments are shown. **B:** Triglyceride and fatty acid content in fed livers from unspecific shRNA (Ad-shCT; ■;  $n = 14$ ) or PEPCK-C-targeted (Ad-shPck1; □;  $n = 16$ ) treatment. Data are means  $\pm$  SE; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . **C:** Expression of significant genes involved in glycolysis and lipogenesis (*fasn*, *sreb1f1*, *chrebp*, *mod1*, *gck*, and *lxr- $\alpha$* ) was examined. Livers were obtained in fed state 14 days after infection with Ad-shCT ( $n = 10$ ; ■) or Ad-shPck1 ( $n = 11$ ; □). Gene expression was quantified by quantitative RT-PCR using Applied Biosystems 7900HT Micro Fluidic Card, and data were analyzed using the  $\Delta\Delta C_t$  method and  $\beta$ -2-microglobulin as housekeeping gene. Each value represents the mean relative amount of mRNA with respect to that in the control experimental treatment. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Student's *t* test. **D:** Protein levels of glycolytic and lipogenic enzymes and transcription factors in livers from fed animals 14 days after treatment were analyzed by Western blot from total liver extracts. Blots are representative of three independent experiments. **E:** Densitometric quantification of blots represented in **D** and **F**. Data are means  $\pm$  SE,  $n = 5-19$ ; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Student's *t* test. ■, Ad-shCT group; □, Ad-shPck1 group. **F:** Western blot analysis of ACC protein content and phosphorylation levels (ACC-P Ser<sup>79</sup>) in fed livers from Ad-shCT and Ad-shPck1 groups. Blots were normalized with  $\gamma$ -tubulin. Representative

TABLE 2  
Nucleotide and short-chain acyl-CoA content in fed *db/db* livers

	AMP ( $\mu\text{mol/g}$ )	ADP ( $\mu\text{mol/g}$ )	ATP ( $\mu\text{mol/g}$ )	CEC	Acetyl-CoA (nmol/g)	Propionyl- CoA (nmol/g)	Succinyl-CoA (nmol/g)	Malonyl-CoA (nmol/g)
Ad-shCT	1.05 $\pm$ 0.06	1.24 $\pm$ 0.08	1.02 $\pm$ 0.08	0.47 $\pm$ 0.01	140.13 $\pm$ 1.95	48.12 $\pm$ 0.84	31.44 $\pm$ 3.12	2.079 $\pm$ 0.239
Ad-sh <i>Pck1</i>	0.77 $\pm$ 0.11*	1.16 $\pm$ 0.07	1.47 $\pm$ 0.17†	0.54 $\pm$ 0.02†	130.29 $\pm$ 2.47	56.68 $\pm$ 1.25†	31.31 $\pm$ 2.10	4.472 $\pm$ 0.932*

Data are means  $\pm$  SE,  $n = 8$ ; \* $P < 0.05$ ; † $P < 0.01$  vs. control virus treatment; unpaired Student's  $t$  test. Tissue was obtained 14 days after treatment. CEC = (ATP + 1/2 AMP)/(ATP + ADP + AMP).

unchanged fasting glycemia. Accordingly, fasting glycemia was significantly reduced in treated animals when PEPCK-C was 90% silenced (Supplementary Fig. 1).

Improved glucose tolerance and insulinemia suggest increased peripheral insulin sensitivity. Lower insulin levels could be secondary to reduced glycemia, however, phloridzin treatment, which inhibits intestinal glucose uptake and renal reabsorption, has been shown to reduce glycemia with no effects on insulin sensitivity in a type 2 diabetes mouse model (22). Moreover, an ameliorated intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT) and higher insulin-stimulated AKT phosphorylation in muscle and adipose tissue strongly support the hypothesis of an insulin-sensitizing effect. In adipose tissue, AKT phosphorylation at Thr 308 was unchanged by either treatment. However, it has been shown that insulin-stimulated glucose uptake is independent of signaling through Thr<sup>308</sup> and closely matches Ser<sup>473</sup> AKT-P levels (23). The QUICKI index was also suggestive of an overall reduction in insulin resistance. In addition, hepatic PEPCK-C silencing improves clinical symptoms of type 2 diabetes, such as polydipsia, polyuria, and glycosuria, as revealed by metabolic cage studies (data not shown). Cross talking between liver and brain through the vagal nerve (24) could be responsible for a coordinated metabolic regulation in peripheral tissues in response to hepatic energy metabolism modulation, affecting systemic insulin sensitivity (25).

Interestingly, despite hepatic lipid accumulation, AKT phosphorylation was also evident in the liver of PEPCK-C-silenced mice. Hepatic lipidosis is commonly associated with the induction of insulin resistance through incompletely understood mechanisms. Recent reports have demonstrated that lipid-induced hepatic insulin resistance is not mediated by fatty acid or TAG accumulation per se (26,27). Instead, diacylglycerol induces insulin resistance via activation of PKC $\epsilon$  translocation to the vicinity of insulin receptor substrate-2 (17). In agreement with AKT phosphorylation data, we have observed that PKC $\epsilon$  is not modulated by PEPCK-C silencing, reinforcing the current view that lipid accumulation is not necessarily linked to insulin resistance in the liver.

Dislipidemia is associated with obesity and insulin resistance in type 2 diabetes (28). PEPCK-C silencing resulted in reduced plasma TAG, together with an important elevation of hepatic lipids, mainly nonsterified fatty acids. An important, not sufficiently appreciated role for PEPCK-C in the liver is glyceroneogenesis: the provision of glycerol-3-phosphate to sustain fatty acid re-esterification for triglyceride synthesis (29,30). Therefore, PEPCK-C silencing could induce a significant reduction in fatty acid

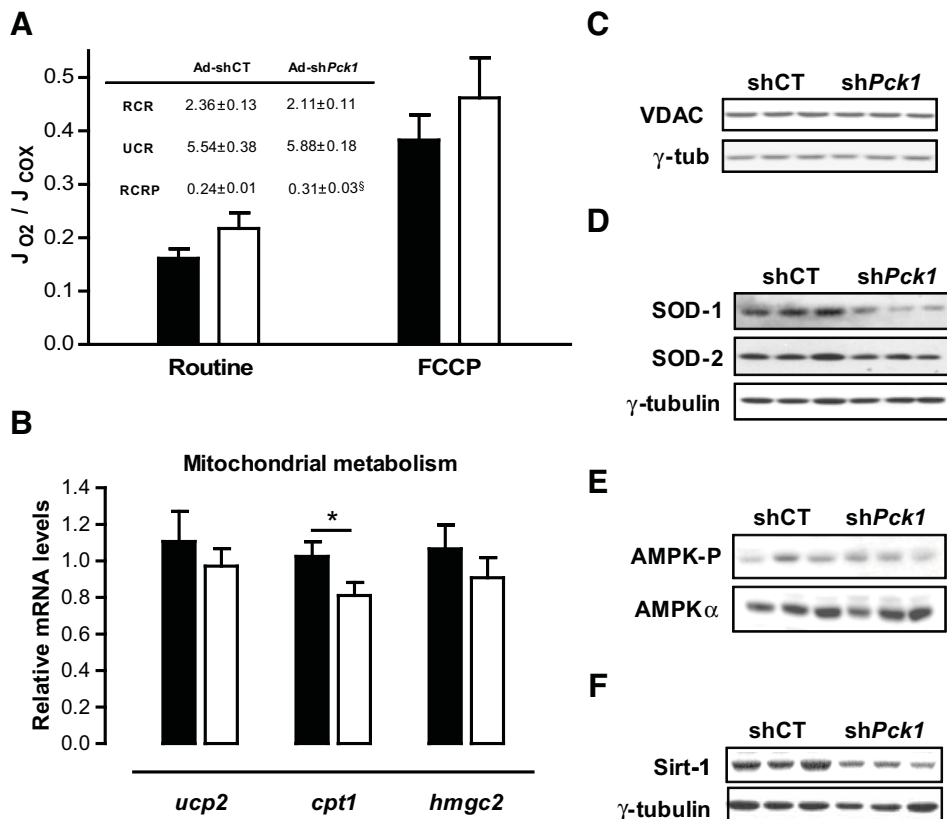
re-esterification activity. How to reconcile a concomitant increase in liver TAG and a reduction of TAG in plasma is not apparent. However, elevated fatty acids in the liver could be originated from excess import, reduced oxidation and/or increased de novo synthesis. Results presented above, support that PEPCK-C-silenced livers maintain mitochondrial function. Long- and medium-chain fatty acid oxidation is highly regulated through its import into the mitochondria at the level of CPT-1. Reduced CPT-1 mRNA levels in PEPCK-C-silenced animals, together with increased malonyl-CoA content, a potent allosteric inhibitor of CPT-1, provide indirect evidence for a slight inhibition of fatty acid oxidation. However, this allosteric inhibition can be overridden by fatty acid abundance (31,32). Moreover, it is clear from our data that no blockade at the level of mitochondria is responsible for the accumulation of fatty acids because  $O_2$  consumption in the presence of octanoate, which is imported into mitochondria independently of CPT-1, is unaffected in PEPCK-C-silenced hepatocytes. Also, increased plasma ketones and cellular propionyl-CoA, is suggestive of maintained mitochondrial and increased peroxisomal oxidation. Actually, after a low-dose ciprofibrate-mediated peroxisome proliferation, SOD expression is modulated with a similar pattern to that observed in our model (18).

The contribution of de novo lipogenesis to the accumulation of TAG and fatty acids seen in livers of Ad-sh*Pck1* treated mice can also be discarded. Key regulatory factors involved in lipogenesis were either maintained (ChREBP) or reduced (SREBP1c and LXR- $\alpha$ ). Lipogenic enzymes regulated by these factors (ACC and FAS) were unaltered, suggesting a main contribution of ChREBP in gene expression regulation of these targets. Whether liver GK might be a target gene for SREBP1c-mediated induction has remained controversial (33,34). Our data revealed no alteration on GK mRNA or protein levels, suggesting that the LXR- $\alpha$ /SREBP1c axis is not directly regulating GK in our model, in agreement with results obtained by Mitro et al. (35) using a LXR- $\alpha$  agonist.

Fatty acid uptake and activation could instead contribute to the liver fat accumulation and to decreased serum TAG and FFA. FFA import and activation into the liver is an ATP consuming step that could be sustained by the increased CEC. Therefore, lipid accumulation in the liver might be multifactorial, involving increased uptake from peripheral fat stores and reduced triglyceride synthesis, VLDL assembly, and export.

Liver-specific knockout animals are euglycemic and able to bypass the complete absence of PEPCK-C activity in their livers with extrahepatic gluconeogenesis (8). Burgess

blots from three independent experiments are shown. *G*: Liver cytosolic and membrane fraction were isolated as described in RESEARCH DESIGN AND METHODS. Membrane and cytosol fractions (50  $\mu\text{g}$ ) were loaded in a 10% SDS-PAGE. PKC $\epsilon$  protein content in each fraction was detected by Western blot. Cellular fraction enrichment was assessed with immunodetection of membrane (EGFR) and cytosolic (L-PK) proteins. Representative blots are shown. *H*: Densitometric quantification of blots shown in *G* demonstrates unaltered membrane translocation from cytosol of PKC $\epsilon$  after PEPCK-C silencing. Data are means  $\pm$  SE,  $n = 6$ . ■, Ad-shCT; □, Ad-sh*Pck1* group.



**FIG. 6.** Energy homeostasis in the liver in response to PEPCK-C silencing. **A:** High-resolution respirometry in isolated hepatocytes from fed mice 14 days after infection with Ad-shCT (■) or Ad-shPck1 (□) was measured in gluconeogenic medium as described in RESEARCH DESIGN AND METHODS. Measurements of the different mitochondrial chain respiratory states were as follows: Routine respiration was measured in the presence of octanoate, followed by the inhibition of ATP synthase with 1  $\mu$ g/ml oligomycin, and uncoupled respiration was initiated by the addition of 1  $\mu$ mol/l FCCP followed by 5  $\mu$ mol/l antimycin A to stop respiration. Finally, cytochrome c oxidase (COX) activity ( $J_{COX}$ ) was measured in the presence of 2 mmol/l ascorbate and 500  $\mu$ mol/l TMPD in each sample. COX activity measurements served as internal measurement normalization. **Inset:** Respiratory indexes (44) were calculated as follows: RCR, an indicator of the extent of respiration uncoupling, is the quotient between fully uncoupled respiration (FCCP) and the respiration in the presence of oligomycin. The UCR, an estimate of the respiratory capacity reserve, is the quotient between fully uncoupled respiration (FCCP) and routine respiration (octanoate). Finally, the RCRP, a coefficient indicating the portion of respiratory capacity applied to ATP synthesis, is calculated by subtracting oligomycin respiration from routine respiration and dividing by FCCP respiration. Data are means  $\pm$  SE ( $n = 5$ ). <sup>s</sup> $P = 0.06$ , Student's  $t$  test. **B:** Expression of significant genes involved in mitochondrial function (*ucp2*, *cpt1*, and *hmgc2*) was examined in fed Ad-shCT ( $n = 10$ ; ■) or Ad-shPck1 ( $n = 11$ ; □) animals. Total RNA was extracted with RNeasy mini kit (Qiagen). cDNA synthesis was performed using Ready-To-Go You-Prime First Strand Beads (Amersham Biosciences) with random hexamers. Gene expression was quantified by quantitative RT-PCR using Applied Biosystems 7900HT Micro Fluidic Card, and data were analyzed using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Gene expression was normalized using  $\beta$ -2-microglobulin as housekeeping gene. Values represent the mean relative amount of mRNA with respect to that in the control experimental treatment (Ad-shCT). \* $P < 0.05$ , Student's  $t$  test. **C:** Mitochondrial inner membrane ADP transporter content VDAC, detected by Western blot, was used as indicator of mitochondrial respiratory chain content. **D:** Cellular protein content of the cytosolic (SOD-1) and mitochondrial (SOD-2) forms of SOD were used as indicators of cellular oxidative stress after hepatic PEPCK-C silencing as detected by Western blot. Representative blots are shown. **E:** Western blot analysis of AMPK protein content and phosphorylation levels (AMPK-P Thr<sup>172</sup>) in fed livers from Ad-shCT and Ad-shPck1 groups. **F:** Sirt1 protein levels in fed livers from control (Ad-shCT) or PEPCK-C silencing adenovirus (Ad-shPck1) animals were estimated by Western blotting. All blots were normalized using  $\gamma$ -tubulin. Representative blots from three independent experiments are shown. **G:** Densitometric quantification of Sirt1 protein content in fed livers performed from blot shown in **F** confirms a significant reduction of the protein in Ad-shPck1 (□) compared with Ad-shCT (■) treatment group. Data are means  $\pm$  SE,  $n = 6$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , Student's  $t$  test.

et al. (36) have presented data demonstrating a weak flux control coefficient for gluconeogenesis in partial PEPCK-C knockout mice, suggesting that other factors like TCA cycle flux, could contribute to gluconeogenic flux independent of PEPCK protein content. Because PEPCK-C is not only required for gluconeogenesis and glyceroneogenesis

but for cataplerosis (i.e., the removal of citric acid cycle anions), the failure of this process would result in an impairment in the TCA cycle and mitochondrial function in the liver, leading to decreased  $\beta$ -oxidation and oxygen consumption, together with a complete derangement in energy metabolism (6,8,9,36). Data presented in this manu-

script, together with our previous study in streptozotocin-induced diabetic animals (12), demonstrate that a 50% reduction of PEPCK expression results in reduced HGO and glycemia. In addition, mitochondrial respiration and CPT-1-independent  $\beta$ -oxidation of fatty acids is not affected, suggesting that TCA cycle flux was sustained as long as intermediates (acetyl-CoA and succinyl-CoA) were not accumulated and ketones were overproduced. The discrepancy among the various studies might be related to one of three factors: 1) Knockout mice have a complete ablation of the PEPCK-C gene in the liver, in contrast to the partial reduction in the enzyme described in this study. In fact, 90% reduction in PEPCK-C protein levels in the liver, obtained with higher adenoviral dosage (Supplementary Fig. 1), reproduce the blockade on mitochondrial function observed in the knockout mice (36). 2) Adaptation to a lack of PEPCK-C in knockout animals as a consequence of deletion of the gene very early during development (37) may induce a compensatory increase in gluconeogenesis in tissues other than the liver. In this regard, a recent study points to a disparity between results obtained from a liver *Ppar- $\alpha$*  knockout mouse and a short-term knockdown model using chemically modified siRNA against *Ppar- $\alpha$*  (38). 3) Studies on liver-specific knockout mice were directed toward understanding the physiological role of PEPCK-C in the liver. To our knowledge, liver PEPCK-C knockout animals have not been previously studied in relevant models of diabetes, such as the one presented in this study.

The coordinated regulation of several key players in energy homeostasis in the livers of Ad-sh*Pck1*-treated animals is an intriguing observation. We have identified Sirt1 as a probable mediator in the response of the cell to a partial reduction in PEPCK-C content. A nutrient signaling response mediated by pyruvate induces Sirt1 protein in liver during fasting, where it interacts with and deacetylates PGC-1 $\alpha$  in an NAD<sup>+</sup>-dependent manner, increasing PGC-1 $\alpha$  ability to coactivate HNF-4 $\alpha$  and, therefore, up-regulate gluconeogenic genes, but not mitochondrial genes (20). In addition Sirt1-mediated deacetylation of FOXO1 has been shown to promote its transcriptional activity over gluconeogenic genes (39,40), suggesting an integrated regulation by insulin and Sirt1 over gluconeogenesis in treated animals. Moreover, Sirt1 transcription is inhibited by a NADH-mediated mechanism (41). In this context, Sirt1 seems to function as a nutrient sensor by decoding fluctuations in cellular NADH levels. Therefore, our observation of a substantial reduction of Sirt1 identifies this nutrient sensor as a potential mediator of the coordinated downregulation of gluconeogenesis. Recent data from Sun et al. (42) have shown that oral administration of resveratrol, an activator of Sirt1, improves glucose homeostasis and insulin sensitivity mainly through its action on muscle. However, the potential for Sirt1 as a therapeutic target for diabetes in the liver is curtailed by its role in gluconeogenesis, as recently suggested by reduced HGO and improved glucose homeostasis and insulin sensitivity in *db/db* mice after hepatic Sirt1 silencing (43).

All in all, we present evidence to sustain that partial silencing of liver PEPCK-C in *db/db* mice leads to improved control of glycemia, insulinemia, and peripheral sensitivity to the hormone through its coordinate inhibition of key players responsible for the activation of liver gluconeogenesis, in the absence of a blockade at the level of mitochondria. In addition, we show that this model

represents a departure from the view, recently challenged, that steatosis leads to insulin resistance. Finally, our observations join the growing body of evidence that indicates that PEPCK-C plays a key role in the control of hepatic energy metabolism in type 2 diabetes animals, validating liver PEPCK-C as a target for pharmaceutical intervention. Nonetheless, in view of the known discrepancy between the large contribution of gluconeogenesis to hepatic glucose production in small rodent models as compared to large animals (i.e., canine, human) the suitability of the approach should be further tested in a larger animal model.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Alicia G. Gómez-Valadés has received a fellowship from IDIBELL. Anna Vidal-Alabré has received a fellowship from DURSI (Generalitat de Catalunya). Andrés Méndez has received a fellowship from F.P.I. (Ministerio de Educación y Ciencia). This study was supported by a grant from the Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-02802).

We thank the Research Support Services from the Biology Unit of Bellvitge (University of Barcelona) for their technical assistance, the UPV-CBATEG (Universitat Autònoma de Barcelona) for amplification and preparation of adenovirus, Dr. Anna Serafin for her skillful assistance with histopathology, and Dr. Maria Molas for her invaluable assistance reviewing the manuscript.

#### REFERENCES

- DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173-194, 1991
- Consoli A, Nurjhan N, Capani F, Gerich J: Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes* 38:550-557, 1989
- Hanson RW, Reshef L: Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* 66:581-611, 1997
- Sun Y, Liu S, Ferguson S, Wang L, Klepcyk P, Yun JS, Friedman JE: Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *J Biol Chem* 277:23301-23307, 2002
- Valera A, Pujol A, Pelegrin M, Bosch F: Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9151-9154, 1994
- Burgess SC, Hausler N, Merritt M, Jeffrey FM, Storey C, Milde A, Koshy S, Lindner J, Magnuson MA, Malloy CR, Sherry AD: Impaired tricarboxylic acid cycle activity in mouse livers lacking cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem* 279:48941-48949, 2004
- She P, Shiota M, Shelton KD, Chalkley R, Postic C, Magnuson MA: Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Mol Cell Biol* 20:6508-6517, 2000
- She P, Burgess SC, Shiota M, Flakoll P, Donahue EP, Malloy CR, Sherry AD, Magnuson MA: Mechanisms by which liver-specific PEPCK knockout mice preserve euglycemia during starvation. *Diabetes* 52:1649-1654, 2003
- Hakimi P, Johnson MT, Yang J, Lepage DF, Conlon RA, Kalhan SC, Reshef L, Tilghman SM, Hanson RW: Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the critical role of cataplerosis in the control of hepatic metabolism. *Nutr Metab (Lond)* 2:33, 2005
- Cao H, van der Veer E, Ban MR, Hanley AJ, Zinman B, Harris SB, Young TK, Pickering JG, Hegele RA: Promoter polymorphism in PCK1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase gene) associated with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 89:898-903, 2004
- Landau BR, Wahren J, Chandramouli V, Schumann WC, Ekberg K, Kalhan SC: Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J Clin Invest* 98:378-385, 1996
- Gomez-Valades AG, Vidal-Alabro A, Molas M, Boada J, Bermudez J, Bartrons R, Perales JC: Overcoming diabetes-induced hyperglycemia through inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) with RNAi. *Mol Ther* 13:401-410, 2006
- Zeini M, Hortelano S, Traves PG, Gomez-Valades AG, Pujol A, Perales JC,

- Bartrons R, Bosca L: Assessment of a dual regulatory role for NO in liver regeneration after partial hepatectomy: protection against apoptosis and retardation of hepatocyte proliferation. *FASEB J* 19:995-997, 2005
14. Demoz A, Garras A, Asiedu DK, Netteland B, Berge RK: Rapid method for the separation and detection of tissue short-chain coenzyme A esters by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 667:148-152, 1995
15. Hrebicek J, Janout V, Malincikova J, Horakova D, Cizek L: Detection of insulin resistance by simple quantitative insulin sensitivity check index QUICKI for epidemiological assessment and prevention. *J Clin Endocrinol Metab* 87:144-147, 2002
16. Saha AK, Ruderman NB: Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership. *Mol Cell Biochem* 253:65-70, 2003
17. Samuel VT, Liu ZX, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, Zhang XM, Monia BP, Bhanot S, Shulman GI: Inhibition of protein kinase C epsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 117:739-745, 2007
18. Dhaunsli GS, Singh I, Orak JK, Singh AK: Antioxidant enzymes in ciprofibrate-induced oxidative stress. *Carcinogenesis* 15:1923-1930, 1994
19. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW: AMP-activated protein kinase: development of the energy sensor concept. *J Physiol* 574:7-15, 2006
20. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P: Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434:113-118, 2005
21. Ruijter JM, Gieling RG, Markman MM, Hagoort J, Lamers WH: Stereological measurement of porto-central gradients in gene expression in mouse liver. *Hepatology* 39:343-352, 2004
22. Zhao H, Yakar S, Gavrilova O, Sun H, Zhang Y, Kim H, Setser J, Jou W, LeRoith D: Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* 53:2901-2909, 2004
23. Ono H, Katagiri H, Funaki M, Anai M, Inukai K, Fukushima Y, Sakoda H, Ogihara T, Onishi Y, Fujishiro M, Kikuchi M, Oka Y, Asano T: Regulation of phosphoinositide metabolism, Akt phosphorylation, and glucose transport by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 15:1411-1422, 2001
24. Poci A, Obici S, Schwartz GJ, Rossetti L: A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metab* 1:53-61, 2005
25. Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Iwasaki H, Ishihara H, Sasano H, Inukai K, Mizuguchi H, Asano T, Shiota M, Nakazato M, Oka Y: Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science* 312:1656-1659, 2006
26. Monetti M, Levin MC, Watt MJ, Sajan MP, Marmor S, Hubbard BK, Stevens RD, Bain JR, Newgard CB, Farese RV Sr, Hevener AL, Farese RV Jr: Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab* 6:69-78, 2007
27. Choi CS, Savage DB, Kulkarni A, Yu XX, Liu ZX, Morino K, Kim S, Distefano A, Samuel VT, Neschen S, Zhang D, Wang A, Zhang XM, Kahn M, Cline GW, Pandey SK, Geisler JG, Bhanot S, Monia BP, Shulman GI: Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J Biol Chem* 282:22678-22688, 2007
28. Kahn SE, Prigeon RL, Schwartz RS, Fujimoto WY, Knopp RH, Brunzell JD, Porte D Jr: Obesity, body fat distribution, insulin sensitivity and islet beta-cell function as explanations for metabolic diversity. *J Nutr* 131:354S-360S, 2001
29. Beale EG, Hammer RE, Antoine B, Forest C: Glyceroneogenesis comes of age. *FASEB J* 16:1695-1696, 2002
30. Kalhan SC, Mahajan S, Burkett E, Reshef L, Hanson RW: Glyceroneogenesis and the source of glycerol for hepatic triacylglycerol synthesis in humans. *J Biol Chem* 276:12928-12931, 2001
31. Drynan L, Quant PA, Zammit VA: Flux control exerted by mitochondrial outer membrane carnitine palmitoyltransferase over beta-oxidation, ketogenesis and tricarboxylic acid cycle activity in hepatocytes isolated from rats in different metabolic states. *Biochem J* 317:791-795, 1996
32. Drynan L, Quant PA, Zammit VA: The role of changes in the sensitivity of hepatic mitochondrial overt carnitine palmitoyltransferase in determining the onset of the ketosis of starvation in the rat. *Biochem J* 318:767-770, 1996
33. Hansmann F, Mordier S, Iynedjian PB: Insulin induction of glucokinase and fatty acid synthase in hepatocytes: analysis of the roles of sterol-regulatory-element-binding protein-1c and liver X receptor. *Biochem J* 399:275-283, 2006
34. Gregori C, Guillet-Deniau I, Girard J, Decaux JF, Pichard AL: Insulin regulation of glucokinase gene expression: evidence against a role for sterol regulatory element binding protein 1 in primary hepatocytes. *FEBS Lett* 580:410-414, 2006
35. Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Kreuzsch A, Saez E: The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445:219-223, 2007
36. Burgess SC, He T, Yan Z, Lindner J, Sherry AD, Malloy CR, Browning JD, Magnuson MA: Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver. *Cell Metab* 5:313-320, 2007
37. Tilghman SM, Belayew A: Transcriptional control of the murine albumin/alpha-fetoprotein locus during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:5254-5257, 1982
38. De Souza AT, Dai X, Spencer AG, Reppen T, Menzie A, Roesch PL, He Y, Caguyong MJ, Bloomer S, Herweijer H, Wolff JA, Hagstrom JE, Lewis DL, Linsley PS, Ulrich RG: Transcriptional and phenotypic comparisons of Ppara knockout and siRNA knockdown mice. *Nucleic Acid Res* 34:4486-4494, 2006
39. Nakae J, Cao Y, Daitoku H, Fukamizu A, Ogawa W, Yano Y, Hayashi Y: The LXXLL motif of murine forkhead transcription factor FoxO1 mediates Sirt1-dependent transcriptional activity. *J Clin Invest* 116:2473-2483, 2006
40. Frescas D, Valenti L, Accili D: Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenic genes. *J Biol Chem* 280:20589-20595, 2005
41. Zhang Q, Wang SY, Fleuriel C, Leprince D, Rocheleau JV, Piston DW, Goodman RH: Metabolic regulation of SIRT1 transcription via a HIC1: CtBP corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:829-833, 2007
42. Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, Zhai Q: SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab* 6:307-319, 2007
43. Rodgers JT, Puigserver P: Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12861-12866, 2007
44. Kuznetsov AV, Strobl D, Ruttman E, Konigsrainer A, Margreiter R, Gnauer E: Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Anal Biochem* 305:186-194, 2002



---

ADDENDUM:  
TRANSFERÈNCIA GÈNICA NO VÍRICA  
MEDIADA PER RECEPTOR

---



---

 INTRODUCCIÓ
 

---

Les tècniques de transferència gènica mediada per receptor aprofiten la capacitat dels receptors de membrana d'una gran varietat de tipus cel·lulars d'unir i internalitzar un lligand. Un vector de transferència gènica mediada per receptor consta de l'àcid nucleic (que pot ser DNA plasmídic, oligonucleòtids, RNA o quimeres de DNA/RNA) conjugat a un policatió unit covalentment al lligand, que serà reconegut pel receptor (Figura 81).

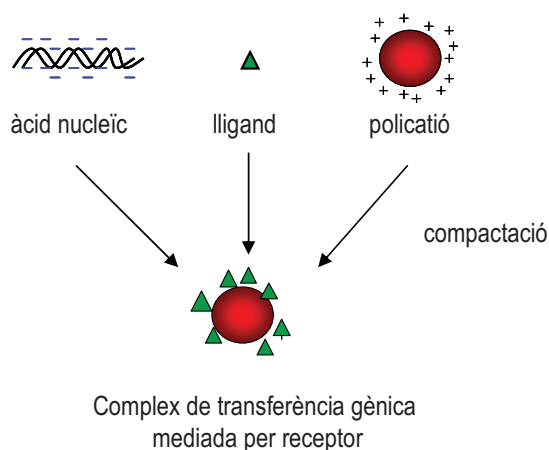


Figura 81. Elements que configuren un vector no viral per a la transferència gènica mediada per receptor.

Durant el procés d'endocitosi mediada per receptor existeixen diferents barreres que l'oligonucleòtid ha de superar abans d'arribar al nucli (Figura 82). El primer pas en l'endocitosi mediada per receptor és la unió específica del receptor amb el seu lligand, es formen vesícules endocítiques primàries que internalitzen aquests complexos i es fusionen entre elles formant endosomes de reciclatge. Durant la migració a través del citoplasma, es va acidificant el compartiment endosomal. Aquesta acidificació provoca la ruptura de les unions sensibles a pH entre el lligand i el receptor, cosa que desemboca en la dissociació entre ambdós. El receptor és reciclat pels endosomes de reciclatge cap a la membrana plasmàtica. El lligand es va acumulant als endosomes tardans, als quals es fusionen vesícules que contenen enzims lisosòmics, induint la maduració d'aquests endosomes tardans cap a lisosomes madurs. Idealment, el vector hauria de ser capaç d'escapar dels endosomes abans de ser degradats. Un cop al citoplasma el material genètic, quan es tracta de cDNA que s'ha transcriure, ha de

translocar al nucli. Finalment, l'expressió del material genètic ha d'exercir una activitat terapèutica, a nivell local o sistèmic.

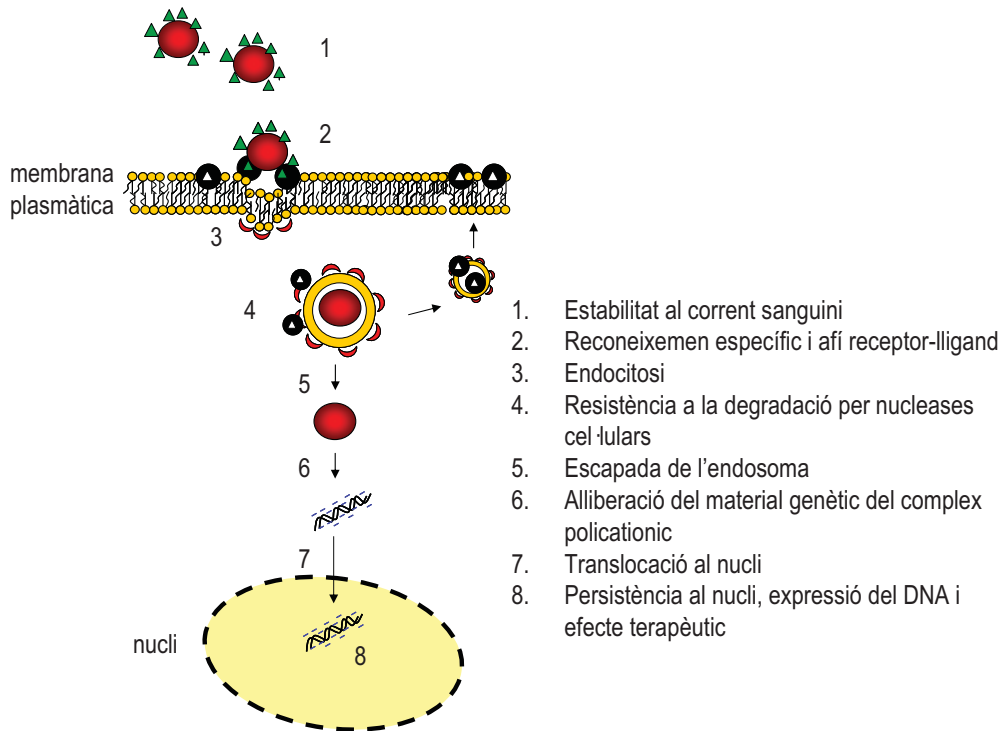


Figura 82. Factors limitants en la internalització del complex DNA-policatió.

### Compactació del DNA

En els vectors no virals de teràpia gènica basats en la poli-L-lisina (policatió que aporta amines protonables), aquesta té la doble funció de condensar el DNA (polianió) per interaccions electroestàtiques i proveir un lloc d'anclatge al lligand.

Estudis previs del grup han demostrat que la compactació de DNA amb polímers de lisina en una solució concentrada de sals proporcionava complexos metaestables de mida petita ( $\leq 30$  nm) compatibles amb l'endocitosi a través del receptor de l'asialoglioproteïna, present als hepatòcits (1-7). La compactació del DNA amb una cinètica cooperativa en solució aquosa ja ha estat prèviament descrita al laboratori (8) (Figura 83).

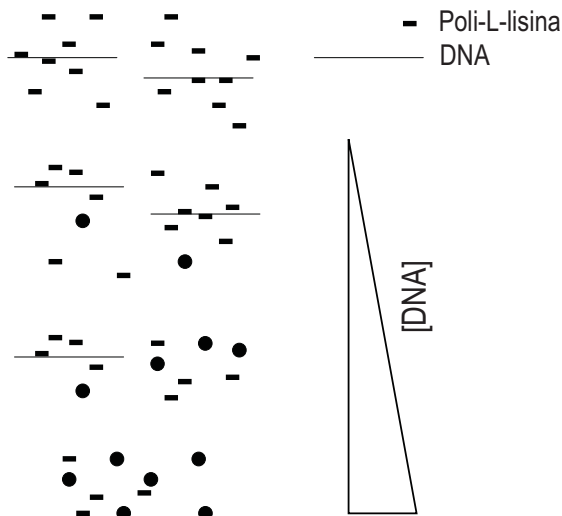


Figura 83. Diagrama esquemàtic de la unió de la poli-L-lisina al DNA en aqua i en presència d'un excès de policatí. Quan a una solució de poli-L-lisina a alta concentració se li addicionen alíquotes de DNA en quantitats subestequiomètriques s'afavoreix la unió cooperativa del policatí al DNA. En aquestes condicions es formen partícules monomoleculares de diàmetre reduït i estructura definida. El diàmetre de la partícula resultant és proporcional al pes molecular del DNA compactat.

### Estabilitat en fluids fisiològics

Els principals obstacles per a una eficient transferència gènica mediada per receptor *in vivo* continua essent la biodisponibilitat dels complexos i, en últim terme, l'entrada al nucli. El transport eficient del complex DNA/policatí del lloc de la injecció fins a la cèl·lula diana depèn de múltiples factors que anatòmics, biològics i fisiològics. La primera gran limitació que hom es troba és l'estabilitat dels complexos en fluids fisiològics. Prèviament en el grup, Molas et al. (9) ja van demostrar que les partícules de DNA/Gal-pK compactades eren incapaces de mediar transferència gènica per receptor *in vitro*. No obstant, aquests complexos es tornen molt inestables en presència de concentracions fisiològiques de ions i tendeixen a agregar i precipitar. Tanmateix, de la mateixa manera que l'estabilitat del complex en fluids fisiològics és essencial per a la seva distribució en el corrent sanguini fins al teixit diana, un cop dins de la cèl·lula és precís que el polímer sigui capaç d'alliberar el DNA per a permetre la seva entrada al nucli i, en últim terme, s'expressi. Addicionalment, s'ha vist que la càrrega de la partícula és un factor determinant en el disseny dels vector no virals en els que la internalització a la cèl·lula és mediada per receptor (9). S'ha demostrat que només les partícules amb una càrrega superficial propera a la neutralitat permeten una la internalització del vector a través de la interacció específica entre el receptor cel·lular i el lligand del vector (10).

El treball que s'adjunta descriu la generació de co-polímers de L-lisina-L-serina i L-lisina-L-triptòfan amb l'objectiu de millorar les característiques biofísiques dels complexos de DNA-poli-L-lisina i, en definitiva, d'inhibir-ne l'agregació quan són diluïts en solucions fisiològiques. En el present estudi hipotetitzem que les forces de van der Waals que promouen l'agregació de les partícules en presència de sals poden ser contrarestades augmentant, o bé la hidrofilitat, o bé la hidrofobitat en la superfície. Hem estudiat la relació entre les característiques hidrofílica/hidrofòbica del co-polímer i l'estabilitat en solucions fisiològiques dels complexos que forma. de sals es va optar per donar hidrofilitat a la superfície dels complexos (afegint serina al polímer de lisina), o donar-li una capacitat estèrica amb característiques hidrofòbiques i apolars (afegint triptòfan). Per a fer els co-polímers específics de receptor se'ls hi va unir un residu galactosil, de manera que els polímers s'uneixin al receptor d'asialoglicoproteïna, i sigui així internalitzat per la via endocítica. S'ha realitzat un estudi exhaustiu de les seves característiques biofísiques en relació a la mida de les partícules formades, l'estabilitat en fluids fisiològics, la capacitat d'alliberació del contingut genètic i la capacitat de mediar la transferència gènica in vivo.

---

**BIBLIOGRAFIA**

---

1. Perales JC, Ferkol T, Beegen H, Ratnoff OD, Hanson RW: Gene transfer in vivo: sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4086-4090, 1994
2. Ferkol T, Perales JC, Eckman E, Kaetzel CS, Hanson RW, Davis PB: Gene transfer into the airway epithelium of animals by targeting the polymeric immunoglobulin receptor. *J Clin Invest* 95:493-502, 1995
3. Ferkol T, Perales JC, Mularo F, Hanson RW: Receptor-mediated gene transfer into macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:101-105, 1996
4. Garcia-Valenzuela E, Rayanade R, Perales JC, Davidson CA, Hanson RW, Sharma SC: Axon-mediated gene transfer of retinal ganglion cells in vivo. *J Neurobiol* 32:111-122, 1997
5. Perales JC, Grossmann GA, Molas M, Liu G, Ferkol T, Harpst J, Oda H, Hanson RW: Biochemical and functional characterization of DNA complexes capable of targeting genes to hepatocytes via the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 272:7398-7407, 1997
6. Ferkol T, Mularo F, Hilliard J, Lodish S, Perales JC, Ziady A, Konstan M: Transfer of the human Alpha1-antitrypsin gene into pulmonary macrophages in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:591-601, 1998
7. Liu G, Molas M, Grossmann GA, Pasumarthy M, Perales JC, Cooper MJ, Hanson RW: Biological properties of poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation. *J Biol Chem* 276:34379-34387, 2001
8. Molas M, Bartrons R, Perales JC: Single-stranded DNA condensed with poly-L-lysine results in nanometric particles that are significantly smaller, more stable in physiological ionic strength fluids and afford higher efficiency of gene delivery than their double-stranded counterparts. *Biochim Biophys Acta* 1572:37-44, 2002
9. Molas M, Gomez-Valades AG, Vidal-Alabro A, Miguel-Turu M, Bermudez J, Bartrons R, Perales JC: Receptor-mediated gene transfer vectors: progress towards genetic pharmaceuticals. *Curr Gene Ther* 3:468-485, 2003
10. Schaffer DV, Lauffenburger DA: Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery. *J Biol Chem* 273:28004-28009, 1998







## Copolymers of poly-L-lysine with serine and tryptophan form stable DNA vectors: implications for receptor-mediated gene transfer

A.G. Gómez-Valadés, M. Molas, A. Vidal-Alabró,  
J. Bermúdez, R. Bartrons, J.C. Perales\*

*Unitat de Biofísica, Departament de Ciències Fisiològiques II, IDIBELL-Universitat de Barcelona,  
Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet, Spain*

Received 28 May 2004; accepted 29 September 2004  
Available online 14 November 2004

### Abstract

Inefficient gene transfer and poor stability in physiological medium are important shortcomings for receptor-mediated gene transfer vectors. Here, we evaluate vectors formulated with random copolymers of L-lysine/L-serine (3:1) and L-lysine/L-tryptophan (4:1), focusing on both their biophysical and functional characterization. By means of dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM), we demonstrate that poly-L-lysine (pK), poly-L-lysine-L-tryptophan (pKW) and poly-L-lysine-L-serine (pKS) are able to form compacted, small particles when mixed with plasmid DNA in the absence of salt. Upon dilution in physiological medium, copolymers of both lys/ser and lys/trp do not aggregate, in contrast with poly-L-lysine DNA complexes as determined by scattering, DLS and TEM measurements. Tight packing, as demonstrated by resistance to heparin, SDS and trypsin treatments, is also featured in tryptophan-containing complexes. Successful receptor-mediated endocytosis gene transfer using galactosylated copolymers into cells expressing the asiagloglycoprotein receptor correlated with lack of aggregation. Particles obtained using galactosylated poly-L-lysine-L-tryptophan (Gal-pKW) copolymer demonstrated specific receptor-mediated gene transfer since reporter gene activity dropped in the presence of an excess ligand in the culture medium during transfection. Although copolymers of galactosylated poly-L-lysine-L-serine (Gal-pKS) do not aggregate in the presence of salt, they are not able to internalize in a specific receptor-mediated endocytosis fashion.

The introduction of bulky aromatic/hydrophobic (tryptophan) or hydrophilic (serine) moieties into the positively charged vectors allows the compacted particles to disperse into salt-containing medium avoiding salt-induced

*Abbreviations:* CMV, cytomegalovirus; DLS, dynamic light scattering; Luc, *Photinus pyralis* luciferase; PEG, poly-(ethyleneglycol); pK, poly-L-lysine; pKS, poly-L-lysine-L-serine; pKW, poly-L-lysine-L-tryptophan; Gal-pK, galactosylated poly-L-lysine; Gal-pKS, galactosylated poly-L-lysine-L-serine; Gal-pKW, galactosylated poly-L-lysine-L-tryptophan; S.E.M., standard error of the mean; TEM, transmission electron microscopy.

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 4024295; fax: +34 93 4024268.

E-mail address: [jperales@ub.edu](mailto:jperales@ub.edu) (J.C. Perales).

aggregation. Moreover, tryptophan-containing particles are able to mediate specific gene transfer via receptor-mediated endocytosis.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Nonviral gene delivery; DNA condensation; Receptor-mediated gene transfer; Poly-L-lysine; Poly-L-lysine-L-serine; Poly-L-lysine-L-tryptophan

## 1. Introduction

Nonviral gene transfer vectors are very attractive candidate drug delivery agents for the pharmaceutical treatment of genetic disorders [1–6], but they still suffer from several drawbacks, mainly poor gene transfer efficiency and stability in physiological medium. Among all nonviral strategies, receptor-mediated gene transfer is especially suitable for the development of genetic pharmaceuticals and has been shown to successfully introduce DNA into targeted cells both *in vitro* and *in vivo* with the advantage of its modular design and safety (reviewed in Refs. [7,8]). This approach involves the formation of a complex between a polycation [i.e., poly-L-lysine (pK)] that has a covalently linked ligand specific for a cell type, and the DNA. The overall level of expression of the transgene in the host cell depends on many factors, including the stability of the complex.

The nature of the vectors commonly used today is highly ionic, since they are built upon the noncovalent electrostatic interaction between two polyelectrolytes: the DNA and a polycation. In a typical formulation, the polycation in the absence of salt tends to neutralize the DNA, promoting aggregation by means of the predominant attractive van der Waals forces resulting from neutralization of ionic charges [9–11]. However, at high polycation concentrations, the particle net positive charge or the excess charged polymer in solution is sufficient to maintain it in suspension. Nevertheless, it is known that even polycation/DNA complexes that are stable in water with an excess polycation tend to either uncouple or aggregate and precipitate at physiological concentrations of salt and serum proteins [12–14], contributing to poor systemic biodistribution and half-life. Whereas stability in physiological medium is not very important for *in vitro* gene transfer (successful nontargeted transfection *in vitro* usually involves aggregation and precip-

itation of the DNA complexes onto the cell surface), it is the first determinant for vector bioavailability and efficiency *in vivo*, altogether influenced by the vector's biophysical characteristics and structure in the DNA compacting medium [15–17]. Thus, proper formulation is very important in order to achieve stable DNA complexes. In this regard, there is general agreement that stabilization of the particle, either steric (by means of covering attractive forces) or electrostatic (creating repulsive forces), could be of importance when designing a nonviral gene therapy vector [8,18–20].

Current artificial self-assembling systems can be obtained from a condensing polycationic moiety and a plasmid DNA for receptor-mediated gene transfer applications that are sterically or electrostatically stabilized. For example, vectors obtained from copolymers of the condensing polycationic moiety (i.e., poly-L-lysine) and polyethylenglycol (PEG) result in structural entities which are stable in physiological ionic strength mainly by blocking the electrostatic interaction of polycation condensed DNA particles in the presence of salt [18,21–24]. PEG is being widely used to provide steric stabilization and increased polymer/DNA complex's half-life in the bloodstream. This type of complex confers increased stability in the presence of salt and serum via solvent exclusion [25–29]. Although successful targeting using pegylated delivery systems [30,31] has been reported, difficulties associated with recognition and efficient receptor-mediated endocytosis of PEG containing targeted complexes have also been demonstrated [23,32], limiting its use for receptor-targeted gene transfer.

We have previously designed vectors that are metastable at high concentrations of salt, allowing the formation of unimolecular DNA complexes of minimum size [1–3,33,34]. The process of DNA condensation at high salt concentration is facilitated by the cooperative electrostatic neutralization of the polyan-

ion (DNA) that ensures proper, tight compaction into small particles that show enhanced delivery via receptor-mediated endocytosis [33,34]. Recently, it has been demonstrated that small-sized vectors of DNA and poly-L-lysine are more amenable for translocation to the nucleus of postmitotic cells and that size imposes an absolute constrain for nuclear import [15].

Disadvantages associated with the use of “high salt” or pegylated DNA complexes for receptor-mediated gene transfer experiments prompted us to envision new avenues for particle stabilization of polycation condensed DNA. In this study, we evaluate novel vectors obtained from random copolymers of L-lysine and L-tryptophan (bulky hydrophobic/aromatic moiety), and L-lysine and L-serine (hydrophilic moiety), as DNA transfection reagents focusing on their biophysical characterization in regard to physical stability in physiological medium and their functionality as receptor-mediated endocytosis-based vectors.

We found that all three copolymers are able to form compacted particles of plasmid DNA in the absence of salts and promote nonspecific gene transfer at similar levels into established cell lines in vitro. The stability in the presence of salt and tighter packing observed for the copolymer of lysine and tryptophan correlated positively with receptor-mediated endocytosis of the DNA particle when directed towards the asialoglycoprotein receptor.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Poly-L-lysine (Cat # P7890), poly-L-lysine-L-tryptophan (pKW; random copolymer, 4:1 lys–trp. Cat # P9285), poly-L-lysine-L-serine (pKS; random copolymer, 3:1 lys–ser. Cat # P9160) and  $\beta$ -D-galactopyranosyl phenyl isothiocyanate (Cat # G3141) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Media, serum and antibiotics were obtained from Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Minimal media (MEM and BME) were from GIBCO-BRL.

### 2.2. Cell culture

The human hepatoma cell line HuH-7 was maintained in Dulbecco's Modified Medium Glutamax

(DMEM; GIBCO-BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin.

### 2.3. Reporter genes and plasmid preparation

The expression vector pCES-luc-SV (6.9 kb in length) was kindly provided by Dr. Mark Cooper and contains the elongation factor-1 promoter and the cytomegalovirus (CMV) enhancer linked to the luciferase gene from *Photinus pyralis*. Plasmid DNA was prepared using Endo-Free Maxi Prep kits (Sigma), and contained no detectable bacterial genomic DNA or RNA contamination by DNA gel electrophoresis. Plasmid DNA preparations had less than 30% open circular or linear DNA.

### 2.4. Production of galactosylated poly-L-lysine, poly-L-lysine-L-serine and poly-L-lysine-L-tryptophan

Poly-L-lysine or the copolymers were galactosylated as described previously [35]. Briefly, 10 mg of poly-L-lysine-HBr (Sigma P-2636, 178 lysine residues in average unless otherwise noted) in 2 ml of water was reacted with 1433  $\mu$ g of  $\beta$ -D-galactopyranosyl phenyl isothiocyanate (Gal-PITC; 5 mg/ml) in a 50% *N,N*-dimethyl formamide–50% water solution. Concentrations used when galactosylating copolymers were adjusted to the corrected amount on the basis of the ratio of lys to ser or trp. The reaction was adjusted to pH 9.5 (pH 9.0 for lys/trp and lys/ser copolymers) by the addition of 1/10 volume of 1 M sodium carbonate pH 9.5 and water to a final volume of 5 ml. The tube was rocked in the dark for 16 h at room temperature, and then dialyzed against 500 ml of water for 2 days with two changes of water per day using Spectra-Por dialysis tubing (3500 M.W. cutoff; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). The reaction results in galactosylation of 5% of the amino groups present in the solution. The amount of galactose derivative present in the galactosylated poly-L-lysine (Gal-pK) can be calculated from internal standard concentrations of Gal-PITC by measuring its absorbance at 254 nm.

### 2.5. Preparation of compacted DNA complexes

Condensation was carried out by slowly adding dropwise aliquots of an aqueous solution of plasmid

DNA (50 µg/ml) to a solution containing equal volume of polycation at a concentration of 200 µg/ml while continuously mixing (N/P=8). The DNA and poly-L-lysine concentrations used were as described above unless otherwise noted (as for N/P=2 and N/P=4). Aliquots of about 50 µl were used and the procedure generally lasted about 5–10 min depending on the volume.

#### 2.6. Size determination using dynamic light scattering (DLS)

A Zetasizer 1000HS photon correlator spectrometer (Malvern Instruments, UK) equipped with a 10-mW, 633-nm laser and APD was used for DLS analysis of compacted complexes both in water and after dilution in 150 mM NaCl. MEM could not be used for dilution since it absorbs light from the laser. Analysis was performed in automatic mode (analysis performed using 10 subruns) and a multimodal analysis (CONTIN) was selected to best fit the data to obtain the mean diameter of the sample particle population.

#### 2.7. Transmission electron microscopy

Samples were applied for 1 min to a carbon-coated copper grid (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA), quickly washed in water and immersed in the contrast stain solution (0.04% uranyl acetate in methanol) for 1 min. Grids were blotted, air-dried and examined in a JEOL-100C transmission microscope at a magnification of 19,000. The microscope was calibrated using the 87.5-Å spacing from a catalase crystal grid [36].

The average size of the DNA complexes in each sample was calculated by measuring the diameter of at least 50 particles using a scanned image of the negative, electronically increasing the magnification to 95,000× from the original negative (19,000×). Size was measured in spherical particles.

#### 2.8. Aggregation assays

A kinetic assay was devised to evaluate the increased turbidity resulting from aggregation of the DNA complexes upon dilution in salt-containing solutions. The complexes in aqueous solution were

diluted 1:10 in minimal medium (MEM, GIBCO-BRL). Three hundred and sixty microliters of MEM was placed in a spectrophotometer cuvette and the basal absorbance was used to zero the device. The reactions were started by adding 40 µl of the DNA complex solution to the medium and quickly mixing. At 2-s intervals, the absorbance at 320 nm was obtained for a total of 60 s. Scattering intensity time tracing was also used to describe the aggregative behavior of DNA complexes upon dilution into 150 mM NaCl. The reactions were started by adding 50 µl of the DNA complex to the medium and quickly mixing. At 5-s intervals, the intensity (no attenuation) of the scattered light was measured using a Zetasizer 1000HS photon correlator for a total of 110 s using the manufacturer's provided software.

#### 2.9. Unpacking and gel retardation assays

Twenty microliters from the aqueous complex solution (approx. 0.5 µg of plasmid DNA) was incubated 60 min with either (i) 0.05% trypsin at 37 °C, (ii) 0.2% SDS [17] or (iii) 0.9% heparin [37]. After short vortexing, the mix was analyzed in a 1% agarose electrophoresis gel.

#### 2.10. Receptor-mediated gene transfer assays

DNA transfection was performed when cells reached approximately 30–50% confluence, i.e., 1 day after seeding of  $0.8 \times 10^6$  cells into 6-well plates. Calcium chloride concentration in the transfecting medium (BME) was 1.8 mM and was not further supplemented. Each well was transfected by adding DNA solution containing 1 µg of DNA directly to 0.5 ml of culture medium. Cells were exposed to DNA complex solution for 2 h at 37 °C in the presence or absence of 100 mM lactose as a competitor for binding to the asialoglycoprotein receptor. The medium was then removed and the cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline. Cells were then placed in fresh DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and incubated 48 h before analysis.

#### 2.11. Luciferase activity in cell extracts

Transfection efficiencies were determined 48 h posttransfection using the Luciferase Assay System

from Promega (Madison, WI, USA) following the protocol provided by the manufacturer.

### 2.12. Measurements of $\zeta$ potential

The  $\zeta$  potential of the various DNA/complex solutions were determined in a Zetasizer 4 (Malvern) based on the laser-Doppler microelectrophoresis technique. The  $\zeta$  potential was calculated from their electrophoretic mobility by means of the Henry correction of the Smoluchowski equation [38],

$$\mu = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta}f(\kappa a)$$

where  $\mu$  is the micelle electrophoretic mobility,  $\eta$  is the aqueous solution viscosity ( $8.9 \times 10^{-3}$  Pa·s), and  $f(\kappa a)$  is the Henry coefficient. In this work,  $f(\kappa a)$  of 1.5 was used throughout these measurements. Experiments were performed in triplicate, and the results given are the average of four measurements at the stationary level. The standard deviation of  $\zeta$  potential values was lower than 5% of the mean.

### 2.13. Statistics

Graphpad Prism v. 4.0.1 software was used to perform graphing and statistical tasks. Multiple comparison analysis was performed using one-way ANOVA statistical analysis and Newman–Keuls posttest. Multiple set comparisons were performed using a two-way ANOVA for two variables and a Bonferroni posttest.

## 3. Results

### 3.1. Size and shape of DNA complexes

All three unmodified polymers utilized in these studies, poly-L-lysine (pK), poly-L-lysine-L-tryptophan (pKW) and poly-L-lysine-L-serine (pKS), were obtained from Sigma and ranged between 15,000 and 20,000 Da average molecular weight. Copolymers are randomly distributed with an input ratio of 1:3 (serine/lysine) and 1:4 (tryptophan/lysine). The choice of polymers aimed at inhibiting aggregation of DNA complexes obtained with an excess polycation upon dilution in salt-containing media by increasing hydrophilicity in the surface of the DNA particles (incorporating L-serine) or steric shielding in a hydrophobic and apolar dispersion (incorporating L-tryptophan residues). We designed these vectors as targets for the asialoglycoprotein receptor by attaching a galactosyl moiety to the lysine epsilon amino group present in the polymers as described in Materials and methods.

We planned an initial set of experiments to determine basic biophysical characteristics of the complexes prepared in water by adding DNA to an excess polycation. Compaction of DNA using this basic formulation has been previously reported [17]. pCES-luc-SV (6.9 kb) plasmid DNA, encoding a reporter luciferase gene, was condensed by addition of the polymers at different charge ratios: N/P=2, N/P=4 and N/P=8, and their size determined using DLS. Data for this initial set of experiments is summarized in Table 1 and demonstrated that N/P=2 was not

Table 1  
DLS and TEM mean diameter of DNA particles

	N/P=2			N/P=4			N/P=8		
	Gal-pK	Gal-pKS	Gal-pKW	Gal-pK**	Gal-pKS***	Gal-pKW***	Gal-pK####	Gal-pKS###	Gal-pKW
Z average diameter (mean nm $\pm$ S.D.) <sup>a</sup>	286 $\pm$ 28.8	146.5 $\pm$ 1	260.3 $\pm$ 3.1	236.3 $\pm$ 2	84.5 $\pm$ 0.9	74.9 $\pm$ 0.7	66.3 $\pm$ 6.3	65.9 $\pm$ 6.3	73.7 $\pm$ 8.8
TEM diameter (mean nm $\pm$ S.E.) <sup>b</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	30.6 $\pm$ 1.1	36.6 $\pm$ 1.6	33.1 $\pm$ 0.9

Two approaches were used to estimate the mean diameter of the particles: <sup>a</sup>dynamic light scattering and <sup>b</sup>manual sizing analysis of TEM micrographs. Values represent the mean  $\pm$  S.D. from five independent experiments (DLS) and mean  $\pm$  S.E. from at least 50 particles measured in a micrograph. nd, not determined.

\*\*  $p < 0.01$ , each copolymer was compared at charge ratios N/P=4 versus N/P=2, using a one-way ANOVA and a Newman–Keuls posttest.

\*\*\*  $p < 0.001$ , each copolymer was compared at charge ratios N/P=4 versus N/P=2, using a one-way ANOVA and a Newman–Keuls posttest.

###  $p < 0.01$ , copolymers compared at charge ratios N/P=8 versus N/P=4 using a one-way ANOVA and a Newman–Keuls posttest.

####  $p < 0.001$ , copolymers compared at charge ratios N/P=8 versus N/P=4 using a one-way ANOVA and a Newman–Keuls posttest.

sufficient for full compaction of the DNA in small [ $Z$  average diameter in nm was  $286 \pm 28.8$ ;  $146.5 \pm 1$  and  $260.3 \pm 3.1$ —nm $\pm$ S.D.—, for Gal-pK, galactosylated poly-L-lysine-L-serine (Gal-pKS) and galactosylated poly-L-lysine-L-tryptophan (Gal-pKW), respectively] and stable (data not shown) particles. Complexes obtained at a N/P=4 charge ratio were significantly smaller ( $Z$  average diameter in nm was  $236.4 \pm 2$  and  $84.5 \pm 0.9$ —nm $\pm$ S.D.—, for Gal-pK and Gal-pKS, respectively), whereas Gal-pKW complexes formed at N/P=4 were  $74.9 \pm 0.7$  (nm $\pm$ S.D.) in diameter, not significantly different than Gal-pKW complexes formed at a N/P=8 ratio counterparts (Table 1). However, their stability upon dilution in solutions containing NaCl (data not shown) was very poor as compared to DNA complexes formed at N/P=8. Therefore, only fully compacted (i.e., small sized) DNA complexes obtained at N/P=8 charge ratio were carried on in all subsequent experiments.

DNA complexes were first visualized by transmission electron microscopy (TEM), and their size and structure determined. Small-sized particles were generated with all polymers tested at this charge ratio. Representative electron micrograph images are shown in Fig. 1A. Condensed DNA is present in two equally frequent structures: spheres and rods when the DNA is compacted using galactosylated poly-L-lysine (Gal-pK) and galactosylated poly-L-lysine-L-serine (Gal-pKS). Interestingly, when galactosylated poly-L-lysine-L-tryptophan (Gal-pKW) is

used as a compaction agent, most of the structures visualized are spheres.

Complexes obtained were further characterized by determining their size in the dispersion medium using photon correlation spectroscopy (Zetasizer 1000HS, Malvern Instruments). A unique population was found for all DNA complexes based on a multimodal analysis (CONTIN) that best fitted the data in the Zetasizer 1000HS correlator. Using this analysis, we obtained a mean diameter of  $66.3 \pm 6.3$ ,  $65.9 \pm 6.3$  and  $73.7 \pm 8.8$  (nm $\pm$ S.D.;  $n=5$ ) for Gal-pK, Gal-pKS and Gal-pKW DNA complexes, respectively (Table 1). In contrast, the diameter of particles manually measured over electronically magnified TEM micrographs, resulted in diameter sizes significantly smaller (Table 1) in agreement with previous reports [17]. Taken together, these data show that compacting a plasmid DNA in water with an excess of the various cationic polymers or copolymers described in this study results in similar size distributions although qualitative analysis demonstrates that only DNA complexes obtained using Gal-pKW are almost exclusively spherical, whereas the other two polymers compact DNA in a mixture of spheres and rods.

### 3.2. Stability of DNA complexes in saline and culture medium

DNA compaction into stable, homogenous particles can be readily achieved in non-NaCl-containing

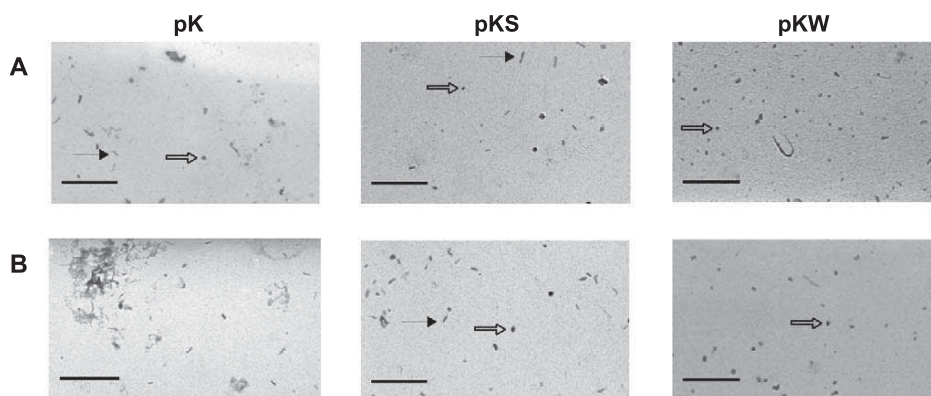


Fig. 1. Transmission electron micrographs of plasmid DNA condensates. (A) pCES-luc-SV (6.9 kb) was condensed and the DNA complex solution dialyzed overnight in water before uranyl-acetate staining and visualization under TEM. Note that when pKW is used, almost all particles are spheres, whereas pK and pKS containing complexes form two structures: spheres (open arrows) and rods (filled arrows). (B) Before uranyl-acetate staining, DNA complexes were diluted 1:10 (v/v) in 150 mM NaCl. The scale bar equals 520 nm.

solutions (i.e., water, 270 mM mannitol, 5% dextrose, etc.) [17]. However, poly-L-lysine/DNA complexes are very sensitive to changes in NaCl concentration; therefore, they often aggregate and precipitate at physiological concentrations of ions.

We attempted to study the relationship between the polymer hydrophylic/hydrophobic surface properties and particle stability in physiological media. To this end, DNA complexes were prepared and observed under TEM after dilution in 150 mM NaCl solution. Gal-pK/DNA complexes aggregate into large amorphous fibers in the presence of salts (Fig. 1B), whereas diluted copolymer complexes observed under TEM do not show any aggregated structures. Micrographs obtained from solutions of nonaggregating copolymer complexes in the presence of salt are not different from those obtained in water (spheres and rods). In order to confirm the qualitative results obtained by means of TEM visualization, we devised a simple procedure to quantitatively test the aggregative behavior of DNA complexes, measuring the time-dependent turbidity increase (absorbance at 320 nm) upon dilution into salt-containing solutions (i.e., MEM). Fig. 2A shows the change in turbidity over time when plasmid DNA condensates are diluted 1:10 in MEM. Similar results were obtained tracing scattering intensity (a more sensitive probe) over time in a Zetasizer 1000HS photon correlator (Fig. 2B). The aggregation kinetics profiled in Fig. 2 are significantly different for copolymer-containing DNA complexes as compared to condensates obtained using poly-L-lysine. Scattering

and turbidity after dilution of the Gal-pK/DNA complex solution rapidly increase, since these complexes aggregate in the presence of salt. In contrast, the aggregation kinetics for Gal-pKS/DNA and Gal-pKW/DNA complexes is much slower and the total absorbance increase at 320 nm at the end of the assay significantly smaller than pK/DNA, demonstrating that polymer composition influences the stability of the final complex in the presence of salt. Similar data has been obtained for nongalactosylated polymer and copolymers (data not shown).

In general agreement with the results described above, further quantitative analysis of samples diluted in 150 mM NaCl using DLS confirmed that DNA/Gal-pK DNA complexes aggregated into increased sized ( $Z$  average  $284.3 \pm 38.1$  nm  $\pm$  S.D.—,  $p < 0.001$ ) particles, whereas DNA/Gal-pKS and DNA/Gal-pKW complexes size ( $Z$  average  $101.4 \pm 7.8$  and  $83 \pm 1.1$  nm  $\pm$  S.D.—, respectively) remains unchanged over the time of the assay (automatic DLS analysis consisted of 10 independent subruns over a period of 5–10 min that are combined into a final size distribution report).

### 3.3. Unpacking of DNA complexes

A stable complex is critical for transport in body fluids. However, DNA particles need to be sufficiently labile to allow proper unpacking once in the nucleus. To evaluate the reversibility of DNA and polycation interaction, we performed a variation of an agarose

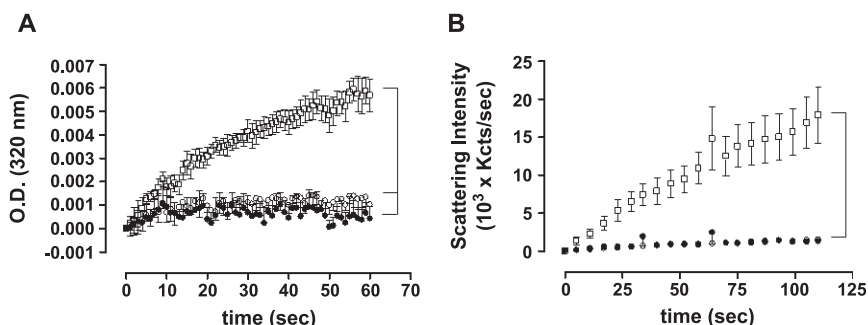


Fig. 2. Aggregation profiles of Gal-pK, Gal-pKS and Gal-pKW containing DNA complexes. pCES-luc-SV plasmid DNA was condensed with Gal-pK ( $\square$ ), Gal-pKS ( $\circ$ ) or Gal-pKW ( $\bullet$ ). Immediately after dilution 1:10 in MEM, the absorbance at 320 nm was monitored every 2 s over a 60-s period (A). Using a photon correlator, the intensity of light scattered over time was traced upon dilution of the DNA complexes into 150 mM NaCl (B). Data shown are the mean  $\pm$  S.E. from three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$ , Gal-pK versus Gal-pKS and Gal-pKW comparison analysis performed using multiple sample, two-way ANOVA and a Bonferroni posttest.

retardation assay for DNA complexes before and after incubation with either (i) a 0.05% trypsin solution, (ii) 0.2% SDS and (iii) 0.9% heparin for 1 h at 37 °C. Compacted DNA has no mobility due to charge neutralization (Fig. 3, lanes 1, 2 and 3). Panel A shows how trypsin, that catalyzes peptide bond hydrolysis of lysine-containing peptides, promoted DNA unpacking from Gal-pK/DNA as well as poly-Gal-pKS/DNA complexes but it did not affect Gal-pKW/DNA complexes (Fig. 3A, lanes 4, 5 and 6). Free DNA can be observed in the gel running as a single band corresponding to the size of the original plasmid DNA. These data may point to a different accessibility of the copolymers to the solvent probably because of closer binding between the DNA and the polycation that may result in an improved protection of the DNA against degradation. In order to test whether lack of accessibility of trypsin to the polymer

was involved in the reduced digestion of Gal-pKW/DNA complexes, we treated DNA complexes with either 0.2% SDS [17] or 0.9% heparin [37], in order to compete for the positively charged DNA-bound polymer. Panels C and, to a lesser extent, B demonstrate the inability of negatively charged SDS and heparin to sequester DNA-bound copolymer and resolve Gal-pKW particle packing, in contrast, again to the almost complete liberation of DNA particles obtained with Gal-pK and Gal-pKS. Therefore, our data strongly suggests that Gal-pKW/DNA complexes are more stable because of an increased core stability.

#### 3.4. Receptor-mediated gene transfer

Receptor-mediated gene transfer into target cells has been used profusely in the past with ligand decorated poly-L-lysine/DNA complexes. The ease

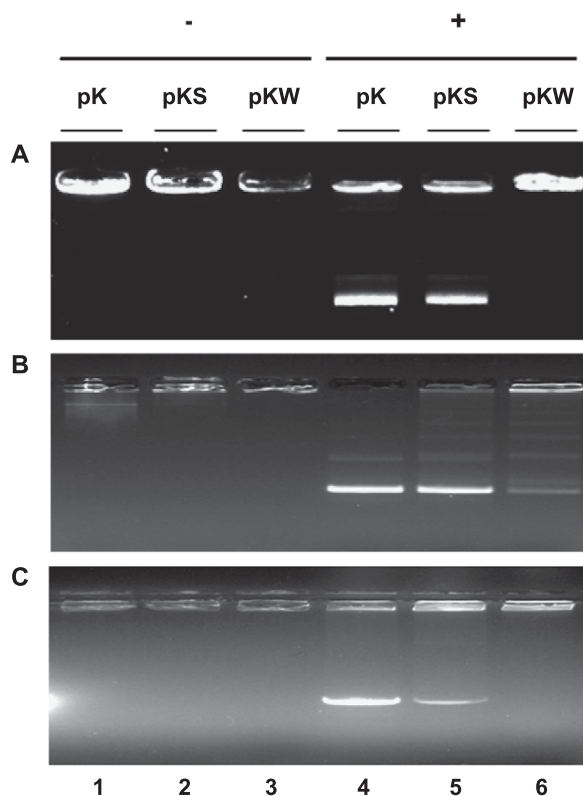


Fig. 3. Gel retardation assay. An aliquot of the various DNA complexes was treated either with trypsin (Panel A), 0.9% heparin (Panel B) and 0.2% SDS (Panel C), as described in Materials and methods. The electrophoretic mobility of complexes before (–) and after (+) incubation with trypsin, heparin or SDS is shown in the figure.



and reproducibility of the compaction of plasmid DNA with galactosylated copolymers and the improved stability and aggregation behavior of the Gal-pKS and Gal-pKW complexes described in this report (Figs. 1 and 2, and Table 1), prompted us to investigate the use of copolymer compacted DNA as receptor-mediated gene delivery vehicles into HuH-7 cells by means of the asialoglycoprotein receptor. HuH-7 is a cell line derived from a human hepatoma that has been shown both, to express functional asialoglycoprotein receptor [39–41], and afford receptor-targeted gene transfer [17,42,43]. The expression vector pCES-luc-SV was slowly added to a vortexing solution containing a 4-fold (w/w) excess of galactosylated polycation (N/P=8). The DNA complex solution was then transfected into HuH-7 cells in the absence or presence of cold ligand (100 mM lactose) and 20 mM glucose as a nonspecific sugar moiety. Luciferase activity was assayed 48 h after transfection. Fig. 4A demonstrates similar levels of luciferase activity regardless of the polymer used. Interestingly, while incubation with 100 mM lactose does not affect the transfection efficiency of Gal-pK or Gal-pKS complexes, it reduces it significantly ( $p < 0.01$ , one-way ANOVA) when added to Gal-pKW transfections. There was no significant reduction of luciferase activity when cells were transfected using

nongalactosylated polymers (Fig. 4B). Reduced luciferase activity in the presence of free lactose in the solution defines a receptor-specific endocytic process for the uptake of Gal-pKW particles. Therefore, pCES-luc-SV compacted with galactosylated pKW can be delivered and expressed in HuH-7 cells using asialoglycoprotein receptor-mediated endocytosis as a specific entry mechanism unlike galactosylated pK or galactosylated pKS, although the copolymer showed similar stability in the presence of salt.

### 3.5. Electrophoretic mobility and particle charge

Particle charge is an important factor in designing receptor-targeted nonviral vectors [7]. We investigated the  $\zeta$  potential of DNA complexes, as a measurement of surface charge in the hydration shell both in water and in the presence of 150 mM NaCl. Table 2 summarizes these data. Several interesting features can be derived from the observation of these data. (i) The charge of the fully compacted DNA particles obtained with Gal-pK and Gal-pKS in water is close to neutrality, whereas (ii) the  $\zeta$  potential of DNA complexes obtained with Gal-pKW was significantly larger, indicating a higher binding capacity of this copolymer to the DNA, perhaps by layering of the copolymer onto the surface of the particle. Interestingly, (iii) in the presence of

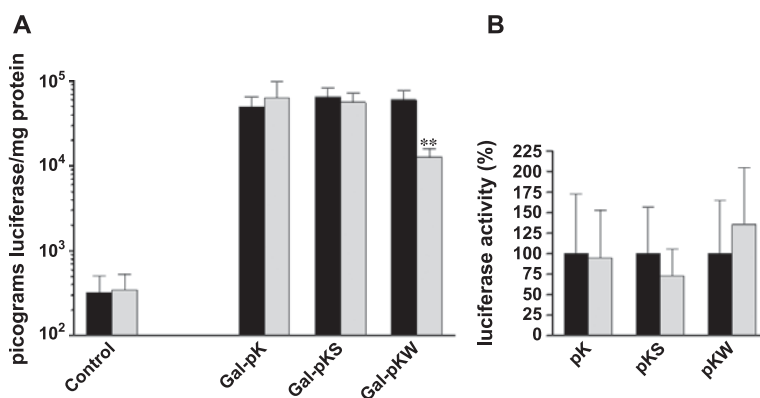


Fig. 4. Transfection efficiency and specificity of compacted DNA introduced into cells via receptor-mediated endocytosis. (A) pCES-luc-SV was condensed in the absence of salt with 5% galactosylated pK, pKS and pKW. DNA complex solution was transfected in triplicate into HuH-7 cells in the absence (uncompleted, filled bars) or presence (lactose 100 mM, empty bars) of a saturating concentration of free ligand. Control corresponds to the background luciferase activity in cellular extracts from untransfected cells. (B) Normalized luciferase activity of nongalactosylated polymers transfected in the absence (uncompleted, filled bars) or presence (lactose 100 mM, empty bars) of a saturating concentration of free ligand. Luciferase activity was measured in duplicate from protein extracts obtained 48 h after transfection. Data shown were standardized against protein content and expressed as an average  $\pm$  S.E.M. from five independent experiments. \*\* $p < 0.01$ , Gal-pKW in the presence of excess competitor ligand versus Gal-pKW performed using multiple sample, two-way ANOVA and a Bonferroni posttest.

Table 2  
 $\zeta$  potential

	$\zeta$ potential (mean mV $\pm$ S.E.)		
	Gal-pK	Gal-pKS	Gal-pKW
Water	$-0.1 \pm 0.5$	$-0.1 \pm 0.5$	$35 \pm 0.8^{***}$
150 mM NaCl	$14 \pm 3.4^{###}$	$15.9 \pm 1.2^{###}$	$17.4 \pm 4.4^{###}$

\*\*\*  $p < 0.001$  vs. Gal-pK and Gal-pKS in water, using a one-way ANOVA and a Newman-Keuls posttest.

###  $p < 0.001$  vs. particle charge in water, using a one-way ANOVA and a Newman-Keuls posttest.

salts the charge of fully compacted DNA particles obtained with Gal-pK and Gal-pKS is significantly larger. In contrast, (iv) Gal-pKW containing DNA complexes afforded a strong reduction of net charge upon dilution in 150 mM NaCl.

#### 4. Discussion

We previously described that compaction of DNA using poly-L-lysine in a high-salt solution results in metastable complexes of minimum size [1–3,33,34,44–47]. In this study, stable compacted DNA vectors are obtained in water with an excess polycation in order to avoid the disadvantages associated with the use of high-salt DNA complexes.

The compaction protocol results in particles with a narrow size distribution, as revealed by DLS and TEM analysis, in agreement with similar formulations previously described by Molas et al. [17]. The formation of properly sized particles is important both to achieve receptor-mediated gene transfer [34] and nuclear import [1,2,15,33]. We have obtained fully compacted (i.e., smallest sized) DNA complexes only at N/P=8 charge ratio and an increased concentration of polymers did not result in additional reduction of size or stability of the complexes. The size of the particles obtained in the experiments reported here is within the limits for proper receptor-mediated gene transfer [34], although larger than the limit set by Liu et al. [15] for nuclear import in postmitotic cellular models. It is important to note that the size of the particles is significantly smaller when measured directly from EM micrographs as compared to solution size obtained using dynamic light scattering. This discrepancy could be accounted by ignoring the measurement of rod structures when particles in TEM

photographs were sized, that might have led to significant error for Gal-pK and Gal-pKS/DNA complexes. However, it should have not affected the measurements of Gal-pKW/DNA complexes where we do not observed rods. A more plausible explanation for such discrepancy is that DNA complexes measured in solution using DLS still contain a hydration layer, whereas those processed for TEM analysis are dried onto the film. Nevertheless, from these data, we can conclude that compaction of plasmid DNA with the various copolymers does not affect significantly the size of the complexes; hence, copolymer composition is not a critical determinant of the size of the particle and the complexes obtained are within the size range required for proper receptor-mediated gene transfer [34].

We wondered whether the use of the poly-L-lysine copolymers could generate significant morphological differences in the structure of the DNA complexes as determined by visual examination under TEM. Qualitative characterization by TEM of DNA complexes revealed slight differences: Gal-pK and Gal-pKS preparations generated two populations of DNA complexes of different morphology (spheroids and ellipsoidal rods) in contrast with Gal-pKW preparations where almost all DNA complexes obtained are in the form of spheroids. The morphological difference suggests a different biophysical behavior of the copolymer carrying tryptophan, but whether this different shape is a consequence of different binding and compaction kinetics or due to a specific role of the polycation in organizing the DNA compaction process [48] is not known.

In this study, we hypothesized that van der Waals forces that promote aggregation of compacted particles in the presence of salt (salt-bridge formation) could be counteracted by increasing particle hydrophilicity or hydrophobicity using copolymers of poly-L-lysine and either hydrophilic (serine) or hydrophobic/aromatic (tryptophan) residues. As hypothesized, pKS and pKW copolymer complexes remained stable in salt-containing medium as determined by qualitative assessment using TEM and quantitatively by DLS and turbidity measurements.

Taken together, these data demonstrate that poly-L-lysine-L-serine and poly-L-lysine-L-tryptophan DNA complexes are highly stable in saline and MEM as compared with poly-L-lysine-containing complexes, a

critical parameter for nonviral vector functionality. This phenomenon may be explained by the incorporation of hydrophilic and hydrophobic/aromatic moieties from the side-chain of the copolymer amino acids. Although the surplus positive charge in the solution containing poly-L-lysine/DNA complexes in the presence of excess polycation maintains the vector stably dispersed in the absence of salts, added salt shields the excess positive charge and promotes aggregation by means of attractive van der Waals forces after substantial salt bridging [10]. Introduction of a hydrophobic/aromatic (tryptophan) or hydrophilic (serine) moiety may prevent aggregation by introducing a repulsive force (serine) or an apolar indole moiety that facilitates hydrophobic collapse (tryptophan) of the polymer onto the core of compacted DNA, resulting in tightly packed DNA and overcoming (at least at the concentrations used in this study) van der Waals attractive forces as suggested by Trubetskoy et al. [49]. Alternatively, the introduction of tryptophan may result in an increased steric stabilization due to augmented bulkiness and shielding of the charges on the surface of the particle, although our data suggests that surface charge ( $\zeta$  potential) is comparable in all complexes in the presence of salts.

Indeed, insufficient solubility of poly-L-lysine/DNA complexes in physiological solutions (serum, cell culture medium, etc.) is a common finding for nonsterically stabilized DNA complexes that may hinder their use as gene therapy vectors. Rapid and infinite dilution after injecting the complex in the blood circulation may well ameliorate the problem [3,33], although improved aggregation kinetics in the copolymers described here may in fact further improve the bioavailability of targeted DNA complexes in vivo.

These findings prompted us to further characterize other aspects of the DNA complexes related to their unpacking capacity. These experiments revealed an almost complete retardation of complexes prepared from tryptophan-containing copolymers after trypsin incubation, indicative of an inability of trypsin to completely digest the lysine residues on the complex. Competition for electrostatic binding to the copolymers using heparin or SDS confirmed these results. Absence of complete trypsin digestion may result from either tighter binding between the polycation and the DNA,

preventing the polycation from accessing the solvent phase or, alternatively, an increased build-up of bound molecules to the DNA particle. Our data suggest that Gal-pK and Gal-pKS/DNA complexes obtained by the addition of small aliquots of DNA to an excess polymer in the absence of salts carry no significant charge (Table 2), whereas the  $\zeta$  potential of DNA complexes obtained with Gal-pKW was significantly larger. Hence, we might hypothesize that the excess Gal-pK or Gal-pKS used to induce monomolecular collapse provides the microenvironment and charge neutralization necessary for DNA collapse but does not induce a significant excess binding of the polymer onto the DNA complex. In contrast, Gal-pKW containing DNA complexes have a significantly higher positive charge, indicating a higher binding capacity of this copolymer to the DNA, perhaps by layering of the copolymer onto the surface of the particle. This behavior could also explain the resistance to unpacking observed when Gal-pKW/DNA complexes were subjected to trypsin, SDS and heparin treatments. Thus, we can conclude that the copolymer-containing tryptophan allows a closer union between DNA and copolymer, perhaps by additional layering of the copolymer to the DNA particle. As previously discussed, tighter packing of DNA may also influence the aggregation of the particles in the presence of salt. In fact, Trubetskoy et al. [49] have shown that self-assembly of polycation condensed complexes using a bis-imidoester cross-linker also results in complexes that are resistant to salt-induced aggregation, suggesting that improved DNA compaction using their formulation was responsible for the higher stability of the complexes in salt. We cannot discard either that the tightness and homogeneity of the structures (see Fig. 1A) obtained using Gal-pKW is partially responsible for improved receptor-mediated gene transfer characteristics of particles obtained with the galactosylated pKW polymer.

These results all in all demonstrate that even when complexes have similar structure, stability of the core depends on the composition of the polycation and its interactions with the medium. Unpacking of the complexes during circulation in body fluids has to be avoided for efficient gene delivery. Stability in saline and MEM and tighter binding of the tryptophan-containing copolymer to the DNA demonstrated here suggest that this type of copolymer could be a candidate for in vivo gene transfer, improving the delivery not

only because of its better stability but also preventing unpacking in body fluids. Although gene expression may be negatively affected if unpacking is not assured once in the nucleus, this possibility is unlikely in view of equivalent gene expression obtained with the various copolymers in this report, although we cannot discard the possibility of partial suppression of gene expression due to incomplete unpacking.

The reproducibility of the compaction process, small size and improved aggregation behavior of the copolymer-compacted DNA described here (see Figs. 1 and 2, and Table 1) hint at a likely effect on the capacity of stabilized complexes to induce receptor-mediated gene transfer. Our aim was to assess the activity of the various DNA vectors described in this report carrying galactosylated polycations as ligands for the asialoglycoprotein receptor. One of the criteria that we have used to determine the specificity of the receptor-mediated endocytic process by which the DNA particle is internalized in the cell is the quantitative inhibition of gene transfer by an excess “cold” ligand (i.e., ligand not bound to DNA). Based on results obtained in this assay, we can conclude that nonspecific transfection levels are similar for poly-L-lysine and the copolymers, but only when pKW was used for compaction, transfection was receptor mediated, that is, a significant reduction in expression following gene transfer was observed in the presence of 100 mM lactose in the culture medium (Fig. 4). Molas et al. [17] have already shown that Gal-pK particles prepared using the protocol utilized in this report fail to show receptor-mediated gene transfer *in vitro*. However, Gal-pK particles prepared using single-stranded DNA are able to mediate receptor-targeted gene transfer, either because of their smaller particle size or the observed increased stability of the single-stranded complexes when diluted in salt-containing medium [17]. Although positively charged DNA complexes have certain advantages regarding homogeneity and ease of formulation, Schaffer and Lauffenburger [50,51] have clearly shown that ligand containing DNA vectors obtained in this manner have physical constraints that impede effective interaction with the targeted receptor in the presence of excess positive charge. However, proper ligand–receptor interaction can be obtained upon shielding of the particle’s net charge. Our data suggests that DNA complexes reported here carry a positive charge in the

presence of salts (Table 2), although Gal-pKW/DNA complexes afforded a decreased positivity upon dilution in 150 mM NaCl whereas Gal-pK and Gal-pKS containing particles increased substantially their surface charge. In view of these data, it is unclear whether charge may have played a differentiating role on the observed improvement of Gal-pKW/DNA complexes as mediators of specific receptor-mediated gene transfer. We hypothesize that the properties of the aromatic/hydrophobic moiety provided by tryptophan residues not only play a role in core stability but also allows surface to solvent interactions in the complex that in turns permits ligand binding to the receptor. Although it has been previously shown [48,52] that polymers of lysine carrying a single tryptophan residue promote gene transfer in a non-targeted delivery system, we have not obtained significant differences in global gene transfer efficiency with the various polymers. This may be due, as intuitively expected from the inability of trypsin, SDS or heparin to completely resolve pKW–DNA interactions *in vitro*, to inefficient unpacking of the DNA complexes once in the cell. We have not quantitated the independent steps in the process of gene delivery and expression; therefore, similar levels of reporter gene activity may be obtained as an aggregate of improved delivery versus reduced unpacking and vice versa for the various polymers used. Global gene transfer efficiency was low compared to commonly used commercial vectors (i.e., PEI and lipofectin; data not shown), although our protocol does not include chloroquine in the transfection mix that aids in receptor-mediated gene delivery [53].

In fact, preliminary experiments *in vivo* have shown no significant luciferase activity in the liver at 24 h after *i.v.* injection of the DNA complexes, together with a marked inhibition on gene transfer to the lung (nonspecific delivery to the lung) as compared to Gal-pK compacted complexes, a positive finding uncommon for DNA complexes obtained using excess polycation (data not shown).

PEG is being widely used to provide steric stabilization and increased polymer/DNA complexes half-life in bloodstream. This type of complex confers increased stability in the presence of salts and serum via solvent exclusion [25–29]. Nevertheless, its use in receptor-targeted gene transfer is limited because of inherent hindrances in such PEG containing com-

plexes for receptor-mediated gene transfer. Several groups have reported successful targeting using pegylated delivery systems [30,31], whereas others have demonstrated difficulties associated with recognition and successful receptor-mediated endocytosis of PEG containing targeted complexes [23,32]. Indeed, pegylated particles may contain an outer shell sterically separated from the solvent phase, and therefore require careful engineering of the ligand spacing moving out from the outer surface of the pegylated particle for proper ligand–receptor binding [22].

Interestingly, although Gal-pKS/DNA complexes showed good stability in salt-containing medium, it failed to provide improved resistance to trypsin digestion, destabilization by heparin, and to mediate specific receptor-mediated gene transfer. This copolymer should present an increased hydrophilicity and a certain level of nonspecific (electrostatic) binding to the cell membrane, due to its positive charge in salt-containing solution, that may impede specific receptor–ligand binding. It is interesting to note that our findings are not in agreement with results obtained using a novel galactosyl-D-lysine/D-serine-PEG condensing polycation reported to mediate gene transfer to the liver [54]. The authors, though, did not test the specificity of the receptor-mediated gene transfer process using competition assays *in vitro*. In addition, the authors used large injection volumes to transfect animals, which is known to yield efficient gene transfer to the liver in a nonspecific manner (hydrodynamic gene transfer).

Since particles of DNA carrying a ligand for a specific receptor may use other nonspecific means of internalization into cells *in vitro* (i.e., electrostatic membrane interaction, precipitation, etc.), as well as *in vivo*, it is important that a specific delivery process is demonstrated prior to its utilization *in vivo*.

## 5. Conclusion

We used three polymers that are able to form compacted particles of plasmid DNA in the absence of salts and promote nonspecific gene transfer at similar levels into established cell lines *in vitro*. The stability in the presence of salt and tighter packing observed for the copolymer of lysine and tryptophan correlated

positively with receptor-mediated endocytosis of the DNA particle when directed towards the asialoglycoprotein receptor.

Taken together, the biophysical characterization, gel shift and transfection experiments are in good agreement and point to a role of the tryptophan residue both in stabilization of the particle and promoting specific interaction between the ligand and cell receptor. Currently, we are evaluating the time course of expression *in vivo* using copolymers of various lengths and a secreted protein marker gene in order to obtain information on the capacity of the copolymers to mediate gene transfer to the liver more efficiently as compared to high-salt galactosylated poly-L-lysine complexes.

## Acknowledgments

The authors are indebted to Drs. Joan Estelrich and Raimon Sabaté for  $\zeta$  potential determinations, and to Dr. Mark Cooper for helpful discussions. Gómez-Valadés, A.G. and Vidal-Alabró, A. were supported by fellowships from F.P.U. “Ministerio de Educación, Cultura y Deporte” (Spain) and F.I. DURSI (Catalonian Government), respectively. This study was supported by grants SAF02-02964 and BFI03-02539 from “Ministerio de Ciencia y Tecnología” (Spain).

## References

- [1] T. Ferkol, J.C. Perales, E. Eckman, C.S. Kaetzel, R.W. Hanson, P.B. Davis, Gene transfer into the airway epithelium of animals by targeting the polymeric immunoglobulin receptor, *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 493–502.
- [2] T. Ferkol, J.C. Perales, F. Mularo, R.W. Hanson, Receptor-mediated gene transfer into macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 101–105.
- [3] J.C. Perales, T. Ferkol, H. Beegen, O.D. Ratnoff, R.W. Hanson, Gene transfer *in vivo*: sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 4086–4090.
- [4] G.Y. Wu, J.M. Wilson, F. Shalaby, M. Grossman, D.A. Shafritz, C.H. Wu, Receptor-mediated gene delivery *in vivo*. Partial correction of genetic analbuminemia in Nagase rats, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 14338–14342.
- [5] J.M. Wilson, M. Grossman, C.H. Wu, N.R. Chowdhury, G.Y. Wu, J.R. Chowdhury, Hepatocyte-directed gene transfer in

- vivo leads to transient improvement of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 963–967.
- [6] A.G. Ziady, T.J. Kelley, E. Milliken, T. Ferkol, P.B. Davis, Functional evidence of CFTR gene transfer in nasal epithelium of cystic fibrosis mice in vivo following luminal application of DNA complexes targeted to the serpin-enzyme complex receptor, *Molec. Ther.* 5 (2002) 413–419.
- [7] M. Molas, A.G. Gomez-Valades, A. Vidal-Alabro, M. Miguel-Turu, J. Bermudez, R. Bartrons, J.C. Perales, Receptor-mediated gene transfer vectors: progress towards genetic pharmaceuticals, *Curr. Gene Ther.* 3 (2003) 468–485.
- [8] G. Kirchweger, Nanoparticles—the next big thing? *Molec. Ther.* 6 (2002) 301–302.
- [9] D. Matulis, I. Rouzina, V.A. Bloomfield, Thermodynamics of cationic lipid binding to DNA and DNA condensation: roles of electrostatics and hydrophobicity, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 7331–7342.
- [10] V.A. Bloomfield, DNA condensation by multivalent cations, *Biopolymers* 44 (1997) 269–282.
- [11] S. He, P.G. Arscott, V.A. Bloomfield, Condensation of DNA by multivalent cations: experimental studies of condensation kinetics, *Biopolymers* 53 (2000) 329–341.
- [12] M. Ogris, S. Brunner, S. Schuller, R. Kircheis, E. Wagner, PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery, *Gene Ther.* 6 (1999) 595–605.
- [13] P.R. Dash, M.L. Read, L.B. Barrett, M.A. Wolfert, L.W. Seymour, Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery, *Gene Ther.* 6 (1999) 643–650.
- [14] C.M. Ward, M.L. Read, L.W. Seymour, Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy, *Blood* 97 (2001) 2221–2229.
- [15] G. Liu, D. Li, M.K. Pasumathy, T.H. Kowalczyk, C.R. Gedeon, S.L. Hyatt, J.M. Payne, T.J. Miller, P. Brunovskis, T.L. Fink, O. Muhammad, R.C. Moen, R.W. Hanson, M.J. Cooper, Nanoparticles of compacted DNA transfect postmitotic cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 32578–32586.
- [16] T. Blessing, J.S. Remy, J.P. Behr, Monomolecular collapse of plasmid DNA into stable virus-like particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 1427–1431.
- [17] M. Molas, R. Bartrons, J.C. Perales, Single-stranded DNA condensed with poly-L-lysine results in nanometric particles that are significantly smaller, more stable in physiological ionic strength fluids and afford higher efficiency of gene delivery than their double-stranded counterparts, *Biochim. Biophys. Acta* 1572 (2002) 37–44.
- [18] S.J. Hwang, M.E. Davis, Cationic polymers for gene delivery: designs for overcoming barriers to systemic administration, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3 (2001) 183–191.
- [19] R.I. Mahato, Non-viral peptide-based approaches to gene delivery, *J. Drug Target.* 7 (1999) 249–268.
- [20] J.A. Wolff, The “grand” problem of synthetic delivery, *Nat. Biotechnol.* 20 (2002) 768–769.
- [21] C.M. Ward, M. Pechar, D. Oupicky, K. Ulbrich, L.W. Seymour, Modification of pLL/DNA complexes with a multivalent hydrophilic polymer permits folate-mediated targeting in vitro and prolonged plasma circulation in vivo, *J. Gene Med.* 4 (2002) 536–547.
- [22] M.C. Woodle, P. Scaria, S. Ganesh, K. Subramanian, R. Titmas, C. Cheng, J. Yang, Y. Pan, K. Weng, C. Gu, S. Torkelson, Sterically stabilized polyplex: ligand-mediated activity, *J. Control. Release* 74 (2001) 309–311.
- [23] D.Y. Kwok, C.C. Coffin, C.P. Lollo, J. Jovenal, M.G. Banaszczyk, P. Mullen, A. Phillips, A. Amini, J. Fabrycki, R.M. Bartholomew, S.W. Brostoff, D.J. Carlo, Stabilization of poly-L-lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver, *Biochim. Biophys. Acta* 1444 (1999) 171–190.
- [24] J. Fominaya, M. Gasset, R. Garcia, F. Roncal, J.P. Albar, A. Bernad, An optimized amphiphilic cationic peptide as an efficient non-viral gene delivery vector, *J. Gene Med.* 2 (2000) 455–464.
- [25] A.S. Sawhney, J.A. Hubbell, Poly(ethylene oxide)-graft-poly(L-lysine) copolymers to enhance the biocompatibility of poly(L-lysine)-alginate microcapsule membranes, *Biomaterials* 13 (1992) 863–870.
- [26] M.A. Wolfert, E.H. Schacht, V. Toncheva, K. Ulbrich, O. Nazarova, L.W. Seymour, Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) 2123–2133.
- [27] C.H. Ahn, S.Y. Chae, Y.H. Bae, S.W. Kim, Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery, *J. Control. Release* 80 (2002) 273–282.
- [28] D. Oupicky, M. Ogris, K.A. Howard, P.R. Dash, K. Ulbrich, L.W. Seymour, Importance of lateral and steric stabilization of polyelectrolyte gene delivery vectors for extended systemic circulation, *Molec. Ther.* 5 (2002) 463–472.
- [29] Y. Park, K.Y. Kwok, C. Boukarim, K.G. Rice, Synthesis of sulfhydryl cross-linking poly(ethylene glycol)-peptides and glycopeptides as carriers for gene delivery, *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 232–239.
- [30] M. Ogris, G. Walker, T. Blessing, R. Kircheis, M. Wolschek, E. Wagner, Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes, *J. Control. Release* 91 (2003) 173–181.
- [31] T. Merdan, J. Callahan, H. Petersen, K. Kunath, U. Bakowsky, P. Kopeckova, T. Kissel, J. Kopecek, Pegylated polyethylenimine-fab’ antibody fragment conjugates for targeted gene delivery to human ovarian carcinoma cells, *Bioconjug. Chem.* 14 (2003) 989–996.
- [32] K. Kunath, T. Merdan, O. Hegener, H. Haberlein, T. Kissel, Integrin targeting of RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer, *J. Gene Med.* 5 (2003) 588–599.
- [33] J.C. Perales, G.A. Grossmann, M. Molas, G. Liu, T. Ferkol, J. Harpst, H. Oda, R.W. Hanson, Biochemical and functional characterization of DNA complexes capable of targeting genes to hepatocytes via the asialoglycoprotein receptor, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 7398–7407.

- [34] G. Liu, M. Molas, G.A. Grossmann, M. Pasumarthy, J.C. Perales, M.J. Cooper, R.W. Hanson, Biological properties of poly-L-lysine–DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 34379–34387.
- [35] M. Monsigny, A.C. Roche, P. Midoux, Uptake of neoglycoproteins via membrane lectin of L1210 cells, *Biol. Cell* 51 (1984) 187–193.
- [36] J.M. Kupfer, X.M. Ruan, G. Liu, J. Matloff, J. Forrester, A. Chaux, High-efficiency gene transfer to autologous rabbit jugular vein grafts using adenovirus–transferrin/polylysine–DNA complexes, *Hum. Gene Ther.* 5 (1994) 1437–1443.
- [37] I. Moret, J. Esteban Peris, V.M. Guillem, M. Benet, F. Revert, F. Dasi, A. Crespo, S.F. Alino, Stability of PEI–DNA and DOTAP–DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin and serum, *J. Control. Release* 76 (2001) 169–181.
- [38] R.J. Hunter, Zeta potential, *Colloid Science*, Academic Press, London, 1981, Chap. 3.
- [39] R.J. Stockert, A.G. Morell, Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 1841–1846.
- [40] J.H. Yik, A. Saxena, P.H. Weigel, The minor subunit splice variants, H2b and H2c, of the human asialoglycoprotein receptor are present with the major subunit H1 in different hetero-oligomeric receptor complexes, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 23076–23083.
- [41] F.Y. Zeng, J.A. Oka, P.H. Weigel, The human asialoglycoprotein receptor is palmitoylated and fatty deacylation causes inactivation of state 2 receptors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218 (1996) 325–330.
- [42] M.M. Mady, M.M. Ghannam, W.A. Khalil, R. Repp, M. Markus, W. Rascher, R. Muller, A. Fahr, Efficient gene delivery with serum into human cancer cells using targeted anionic liposomes, *J. Drug Target.* 12 (2004) 11–18.
- [43] B.T. Kren, A. Cole-Strauss, E.B. Kmiec, C.J. Steer, Targeted nucleotide exchange in the alkaline phosphatase gene of HuH-7 cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide, *Hepatology* 25 (1997) 1462–1468.
- [44] A.G. Ziady, J.C. Perales, T. Ferkol, T. Gerken, H. Beegen, D.H. Perlmutter, P.B. Davis, Gene transfer into hepatoma cell lines via the serpin enzyme complex receptor, *Am. J. Physiol.* 273 (1997) G545–G552.
- [45] E. Garcia\_Valenzuela, R. Rayanade, J.C. Perales, C.A. Davidson, R.W. Hanson, S.C. Sharma, Axon-mediated gene transfer of retinal ganglion cells in vivo, *J. Neurobiol.* 32 (1997) 111–122.
- [46] T. Ferkol, F. Mularo, J. Hilliard, S. Lodish, J.C. Perales, A. Ziady, M. Konstan, Transfer of the human alpha1-antitrypsin gene into pulmonary macrophages in vivo, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18 (1998) 591–601.
- [47] T. Ferkol, J.C. Perales, F. Mularo, R.W. Hanson, Transfer of the gene encoding human  $\alpha$ 1-antitrypsin into macrophages via the mannose receptor, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151 (1995) A544.
- [48] M.S. Wadhwa, W.T. Collard, R.C. Adami, D.L. McKenzie, K.G. Rice, Peptide-mediated gene delivery: influence of peptide structure on gene expression, *Bioconjug. Chem.* 8 (1997) 81–88.
- [49] V.S. Trubetskoy, A. Loomis, P.M. Slattum, J.E. Hagstrom, V.G. Budker, J.A. Wolff, Caged DNA does not aggregate in high ionic strength solutions, *Bioconjug. Chem.* 10 (1999) 624–628.
- [50] D.V. Schaffer, D.A. Lauffenburger, Targeted synthetic gene delivery vectors, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2 (2000) 155–161.
- [51] D.V. Schaffer, D.A. Lauffenburger, Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 28004–28009.
- [52] D.L. McKenzie, W.T. Collard, K.G. Rice, Comparative gene transfer efficiency of low molecular weight polylysine DNA-condensing peptides, *J. Pept. Res.* 54 (1999) 311–318.
- [53] T. Blessing, M. Kurs, R. Holzhauser, R. Kircheis, E. Wagner, Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery, *Bioconjug. Chem.* 12 (2001) 529–537.
- [54] S. Hisayasu, M. Miyauchi, K. Akiyama, T. Gotoh, S. Satoh, T. Shimada, In vivo targeted gene transfer into liver cells mediated by a novel galactosyl-D-lysine/D-serine copolymer, *Gene Ther.* 6 (1999) 689–693.

