

**FACULTAT DE VETERINÀRIA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**EXPRESSIÓ DE GLUCOQUINASA EN MÚSCUL
ESQUELÈTIC: EFECTE EN LA
CONTRARESTACIÓ DE LA DIABETIS MELLITUS**

MARIA ONTIVEROS GONZÀLEZ

Memòria presentada per la llicenciada MARIA
ONTIVEROS GONZÀLEZ per optar al grau de
Doctora en Bioquímica.

Aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzada sota la
direcció de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert al
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de
la Facultat de Veterinària, i al Centre de
Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG).

MARIA ONTIVEROS GONZÀLEZ

FÀTIMA BOSCH I TUBERT

Juny de 2004
BELLATERRA

A mis padres y mi hermano. Por estar a mi lado día a día, incluso estando lejos, dándome vuestro amor, apoyo, ayuda y dedicación en todo momento...Para vosotros, con todo mi cariño.

AGRAÏMENTS

Abans de presentar aquest treball voldria expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que, durant tots aquests anys, han participat d'una manera o altra en la realització d'aquesta Tesi. Moltes gràcies a tots, i espero no deixar-me a ningú...Per cert, l'ordre dels factors no altera el producte...

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies a la Dra. Fàtima Bosch, per acceptar-me al seu grup, per la seva gran dedicació al món de la ciència i per la direcció i supervisió del que ha estat la meva recerca.

Voldria donar les gràcies molt especialment a l'Alba: pel teu ajut des que vaig arribar al laboratori fins a "l'últimísim" moment, per tot el suport científic i moral que m'has donat durant aquest temps... I també per saber escoltar, per animar-me quan ho he necessitat,i, en definitiva, per ser tan "espectacular!"...Moltes gràcies de tot cor!!

A la Tura, per la seva ajuda, la seva curiositat insaciable (aquestes preguntes només les saps fer tu!), per compartir taula amb mi i per totes les seves teories (científiques... o no). Tura, una festa pijama mai seria el mateix sense tu...

Al Dr. Pedro Otaegui por su contribución a este trabajo, por el mítico "Avisados quedais" y por los cuadernos de Ramón y Cajal, que marcaron historia.

Gracias también al Dr. Miguel Chillón, por todo lo que he aprendido (y sigo aprendiendo) de él. Y por tu comprensión, tu apoyo, tu sentido del humor y tu forma de ver las cosas... No tengo remedio, seguiré apostando (y perdiendo) cafés!

A en Joel, per tot el seu ajut. I també per la teva amistat, per donar-me la visió masculina de les coses, per les trobades imprevistes i pel teu interès (però només per temes que valguin la pena, eh?). Ja ho saps,noi : jo? Sempre!!

A la Judith i l'Ariana, per estar sempre disposades a donar-me un cop de mà amb la feina i unes paraules amables en els moments baixos. Ariana, no perdís mai aquesta vitalitat, aquest optimisme, ni aquesta energia desbordant (i per fi algú que es posa més vermella que jo!). Judith, gràcies per ser-hi quan ho necessito, espero que els sopars, les nits de festa i les llargues xerrades continuïn durant molt de temps!

A Sylvie: por estar siempre ahí para aclarar mis dudas, y también por todas las conversaciones “transcendentales”, por tus consejos y por los buenos ratos que hemos pasado juntas, paseo bajo la lluvia incluido... En fin, por todo.

A l'Àlex, per l'ajuda, els congressos (per què sempre són a València?) i els interrogatoris (però de bon rollo!). Al Sergio, por estar siempre dispuesto a ayudarme cuando lo he necesitado, por las cenas de becarios de la facultad y por las croquetas (y no dejes de escribir!!). Al Antonio, que siempre se las arregla para subirme los colores, por ser tan divertido y animar cuando hace falta.

Al Miquel Garcia “Pitón”: per la teva gran amabilitat, el teu sentit de l'humor y per aguantar tants cafès (i temes “apassionants”) amb nosaltres (i que consti que la màquina va morir sola!). A l'Edu, per l'ajuda, les festes al seu pis i les bones estones quan l'hem anat a veure tocar.

A la Vicky, per l'ajuda amb la biblio i el “help” amb l'anglès: y por ser siempre tan cariñosa y saber tanto de todo. Al Xevi, per l'ajuda amb les correccions i les pràctiques del curs, per tot el que em dius sempre, i per la paciència...però mira que no voler!.

A la Marta i la Mireia, pels viatges i els concerts de Daniel. I per l'ajuda: Marta, gracias por la histología; Mire, ets la “reina dels animals” (ho sento, ho havia de dir!). A Mónica, por aquellos inicios en el SAF (ahora estoy “enganchada!”).

A les noies de microinjecció: l'Anna Pujol, l'Anna Arbòs i l'Ainara, per la feina que heu fet, i per la vostra simpatia i bon humor. Als més “jovenets” del grup: l'Albert, el Carles, i la Ivet, per interessar-se pels meus progressos i pels bons moments que hem compartit (i espero que n'hi hagi molts més !). I a les noves incorporacions : la Maria Molas i la Jennifer.

Als doctors que ja no hi són, però que també m'han ensenyat moltes coses : l'Efren, amb la seva peculiar forma d'explicar les coses, i la Malika, puedo hacerte una pregunta ?. També al Xavier Gregori i la Gemma Pascual. I, molt especialment, al Dr. Laurent Gros, per ser tan bon mestre quan vaig entrar al grup, al principi de tot.

Al Carles Ros, per la seva ajuda quan ho he necessitat i per tenir sempre una solució a punt. A l'Anna Vilalta, per preocupar-se sempre de que tot sortís bé i per animar-me.

Voldria, també, agrair al Dr. Jesús Ruberte, al Dr. Marc Navarro, la Verónica Megarejo i la resta de l'equip la seva col.laboració i ajuda fent les immunos: moltes gràcies.

També voldria donar les gràcies als companys de la cinquena planta : a la Dra. Assumpció Bosch, per respondre els meus dubtes i ajudar-me quan ho necessito. A la Dra. Mercè Monfar, per tenir-ho tot tan ben organitzat i per la seva paciència mentre estava acabant d'escriure. Als becaris : el Raul, l'Ester i l'Estel, pels ànims. Y, especialmente, a los otros dos tercios de la UPV, Jose y Susana : gracias por todo vuestro apoyo y ayuda en la fase final de la tesis, es un placer trabajar con vosotros.

Als companys del 181 : l'Amparo, la Raquel, la Loli, la Maria, la Maribel, el Martí, l'Asier, el Xavi...per fer tan divertides les estones de dinar i les nits de festa. I per les converses tan interessants : al Ernesto, mi compañero de cursos ; a l'Ivan, gràcies per la teva amistat (i per compartir dubtes, records, acudits dolents i patates !) i a la Laia, per ser una amiga, escoltar i animar-me sempre, i per ser tan maca en tots els sentits.

A la resta de companys del departament : la Montse, la Clelia, la Laia, la Maria José, la Fàtima, la Lourdes, la Yolanda...gràcies per l'ajuda i les bones estones que hem compartit. Al Nèstor, per dir-me totes aquelles coses com només ell sap fer-ho.

Al Dr. Joaquim Ariño, a la Dra. Anna Bassols i a la Dra. Anna Barceló, per la seva ajuda i el tracte cordial.

A tot l'equip administratiu : el Fede, la Montse, la Rosa, l'Ester i també a l'Esperança, la Teresa i la Toñi, per intentar solucionar-ho tot de la forma més ràpida possible. I a la Carme, per fer-me sempre unes propostes tan interessants, i per ser una gran amiga.

També voldria donar les gràcies a aquells que han compartit les meves penes i alegries els caps de setmana a Sant Feliu : a la Sandra y la Estefanía (no te quejarás, Fani), gracias por ser tan buenas amigas desde hace ya...tropecientos años (y que sean muchos más !!). A en Carles, en Josep, i en Dani, per la vostra amistat, les filosofades i per tot el que hem compartit. I a la Núria, a veure si és veritat allò de les vides paral·leles...A la Mari, por nuestra forma común de ver la vida, y por Firenze. I, com no, a la Núria menorquina, per aguantar-me cada dia quan arribo a casa, pels cafès, els cines i per la defensa de les "fadrines " !.

Aquest treball ha estat possible gràcies, en primer lloc, a la beca predoctoral de la Direcció General d'Universitats de la Generalitat de Catalunya. Les investigacions han estat finançades pel Ministerio de Ciencia y Tecnología, I+D: (CICYT:SAF99-0094; SAF2002-20389), el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 01/0427). A la CIRIT: (1999SGR 00101; 2001SGR 00195). A la Red de grupos del Instituto de Salud Carlos III: (C03/08, G03/054, G03/212). A la Fundació la Marató de TV3 (992710). I al programa de la UE Quality of life and management of living resources (QLRT-1999-00674).

ABREVIATURES

AAV	virus adenoassociats
ADP	adenosina-5'-difosfat
ATP	adenosina-5'-trifosfat
BAT	teixit adipós marró
β-gal	β-galactosidasa
BS	bluescript
BSA	albúmina sèrica bovina
Ca ²⁺	ions calci
cAMP	adenosina-5'-monofosfat cíclica
cDNA	DNA còpia
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
Con	control
cpm	comptes per minut
CRE	element de resposta al cAMP
DAG	diacilglicerol
dATP	desoxiadenosina-5'-trifosfat
dCTP	desoxicitidina-3'-trifosfat
dGTP	desoxiguanosina-5'-trifosfat
2-DG	2-[1-H]deoxi-D-glucosa
dl	decilitres
DCCT	<i>diabetes control and complications trial</i>
DNA	àcid desoxiribonucleic
EDTA	etilendiaminotetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FSH	hormona estimulant del folicle
g	grams
GAD	àcid glutàmic descarboxilasa
G-6-Pasa	glucosa-6-fosfatasa
GK	glucoquinasa
GKRP	proteïna reguladora de la glucoquinasa
glucosa-6-P	glucosa-6-fosfat
GLUT2	transportador de glucosa de tipus 2
GLUT2+GK	animals dobles transgènics MLC/GLUT2 i MLC/GK
GPO	glicerol fosfat oxidasa

GS	glucogen sintasa
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperacina etanosulfat
HLA	antígens leucocitaris humans
HK	hexoquinasa
HMIT	transportador de mioinositol acoblat al transport de protons
IDDM	diabetis mellitus depenent d'insulina
IGF-I	factor de creixement similar a la insulina I
IGF-II	factor de creixement similar a la insulina II
IK $\kappa\beta$	<i>inhibitor of nuclear factor $\kappa\beta$ kinase</i>
IL	interleuquina
IP3	inositol trifosfat
IR	receptor de la insulina
IRS-1	substrat del receptor de la insulina 1
IRS-2	substrat del receptor de la insulina 2
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltons
K _m	constant de Michaelis-Mentem
LB	medi Luria-Bertrani
mg	miligrams
min	minuts
ml	mililitre
mM	milimolar
MAPK	activador mitogènic proteïna quinasa
MHC	complexe major d'histocompatibilitat
MLC	cadena lleugera de la miosina
MLC/GK	gen quimèric promotor MLC-cDNA de la GK de rata
MLC/GLUT2	gen quimèric promotor MLC-cDNA del GLUT2 humà
MLD	<i>multiple low dosis</i>
MODY	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i>
mRNA	RNA missatger
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleòtid fosfat oxidat/reduït
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleòtid oxidat/reduït
n.d.	no descrit
NEFA	àcid greixós no esterificat
NO	òxid nítric
NOD	<i>non obese diabetic</i>

³² P	fòsfor 32
PAS	tinció àcid periodic-Schiff
pb	parells de bases
PBS	tampó fosfat salí
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PEPCK	fosfoenolpiruvat carboxiquinasa
PI-3K	fosfatidil inositol-3- quinasa
PIP2	fosfatidil inositol
PK	piruvat quinasa
PMSF	fluorur de fenilmetil sulfonil
PP	polipèptid pancreàtic
PTP	proteïna tirosina fosfatasa
RIA	radioimmunoassaig
rpm	revolucions per minut
RNA	àcid ribonucleic
RNasa	ribonucleasa
SDS	dodecilsulfat sòdic
SEM	error estàndar de la mitja
SGLT	transportador de glucosa sodi-dependent
SHIP2	<i>SH2 domain-containing inositol-5-phosphatase</i>
SPF	estabulació lliure de patògens
SSC	<i>sodium saline citrate</i>
ssDNA	DNA d'esperma de salmó
STZ	estreptozotocina (2-deoxi-2-(3-metil-3nitrosourea)1glucopyranose
TAE	tampó tris-acetat-EDTA
TdT	dideoxinucleotidiltransferasa
TE	tampó tris-EDTA
Tg	transgènic
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF-α	factor necròtic tumoral α
TNF-β	factor necròtic tumoral β
Tris	tris(hidroximetil)aminometà
TyK	tirosina quinasa
UDP-GlcNAc	UDP-Glucosa-N-Acetilglucosamina
UI	unitats internacionals d'activitat enzimàtica
vol	volum

WAT	teixit adipós blanc
x g	gravetats
Zucker (fa/fa)	rates obeses diabètiques Zucker

ÍNDIX

I. PRESENTACIÓ	1-2
II. INTRODUCCIÓ	3-38
1. HOMEÒSTASI DE LA GLUCOSA.	3
2. EL TRANSPORT DE LA GLUCOSA.	4-10
2.1. Transportadors de glucosa sodi-dependents.	4
2.2. Transport facilitat de glucosa.	5
2.2.1. <i>Transportadors de classe I.</i>	6
2.2.2. <i>Transportadors de classe II.</i>	7
2.2.3. <i>Transportadors de classe III.</i>	8
2.3. El transportador GLUT2.	10
3. LA FOSFORILACIÓ DE LA GLUCOSA.	11-16
3.1. L'enzim glucoquinasa.	12
3.1.1. <i>Característiques cinètiques i funcions específiques de la glucoquinasa.</i>	12
3.1.2. <i>Regulació transcripcional i post-traducciona de la glucoquinasa.</i>	13
3.1.3. <i>Efectes de la sobreexpressió de glucoquinasa en fetge de ratolins.</i>	15
5. LA DIABETIS MELLITUS.	17-20
5.1. La diabetis de tipus 1.	17
5.2. La diabetis de tipus 2.	18
5. MODELS ANIMALS DE DIABETIS MELLITUS.	21-29
5.1. Models animals de diabetis de tipus 1.	21
5.1.1. <i>Models de diabetis espontània: ratolins NOD (non-obese diabetic).</i>	21
5.1.2. <i>Models de diabetis induïts experimentalment: tractament amb estreptozotocina.</i>	22
5.2. Models animals de diabetis de tipus 2.	23
5.2.1. <i>Models espontanis.</i>	24
5.2.2. <i>Models de diabetis de tipus 2 induïts experimentalment.</i>	24
5.2.2.1. <i>Models induïts: dieta alta en lípids.</i>	25
5.2.3. <i>Models genètics induïts per gensupressió.</i>	26
5.2.3.1. <i>Ratolins gensuprimits en IRS-1.</i>	29

6. TERÀPIA GÈNICA PER A LA DIABETIS.	31-38
6.1. Aproximacions de teràpia gènica per a diabetis.	33
6.2. Aproximacions de teràpia gènica centrades en incrementar la captació de glucosa.	35
6.2.1. <i>Paper del múscul esquelètic en l'homeòstasi de la glucosa.</i>	35
6.2.2. <i>Increment de la captació i utilització de la glucosa pel múscul esquelètic</i>	37
III. OBJECTIUS.	39
IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ.	40-110
PART I: EXPRESSIÓ DE LA GK AL MÚSCUL ESQUELÈTIC: PAPER EN LA CONTRARESTACIÓ DE LA DIABETIS DE TIPUS 1.	40-78
INTRODUCCIÓ	40
1. ESTUDI EN RATOLINS DOBLES TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN GLUT2 I GK EN MÚSCUL ESQUELÈTIC DE LA CAPACITAT DE CONTRARESTAR LA HIPERGLUCÈMIA DIABÈTICA.	42-62
1.1. OBTENCIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN GLUT2 EN MÚSCUL ESQUELÈTIC.	42
1.1.1. Construcció del gen quimèric MLC/GLUT2.	43
1.1.2. Generació de ratolins transgènics.	45
1.2. ESTUDI DELS EFECTES PROVOCATS PER L'EXPRESSIÓ DE GLUT2 EN MÚSCUL ESQUELÈTIC D'ANIMALS TRANSGÈNICS.	45
1.2.1. Anàlisi de l'expressió del gen quimèric MLC/GLUT2 en múscul esquelètic.	46
1.2.2. Anàlisi de la presència de la proteïna GLUT2.	47
1.2.2.1. <i>Anàlisi per Western blot.</i>	47
1.2.2.2. <i>Estudi immunohistoquímic de l'expressió de la proteïna GLUT2.</i>	48
1.2.3. Anàlisi de la captació de glucosa pel múscul esquelètic.	49
1.3. ESTUDI DELS EFECTES A NIVELL SISTÈMIC PROVOCATS PER L'EXPRESSIÓ DEL GLUT2.	50
1.3.1. Anàlisi de les concentracions de glucosa, insulina, lactat i altres paràmetres sèrics.	50
1.3.2. Test de tolerància a la glucosa.	51

1.3.3. Test de tolerància a la insulina.	52
1.4. OBTENCIÓ DE RATOLINS DOBLES TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN GLUT2 I GK EN MÚSCUL ESQUELÈTIC.	55
1.4.1. Generació de ratolins dobles transgènics	56
1.5. ESTUDI DE L'EFECTE DE LA INDUCCIÓ DE DIABETIS EXPERIMENTAL EN RATOLINS DOBLES TRANSGÈNICS GLUT2+GK.	56
1.5.1. Estudi de l'expressió dels gens del GLUT2 i la GK en el múscul d'animals tractats amb STZ.	57
1.5.2. Anàlisi de la glucèmia.	58
1.5.3. Test de tolerància a la insulina.	59
2. CONTRARESTACIÓ DEL PROCÉS DIABÈTIC PER TRASPLANTAMENT DE CÈL.LULES MUSCULARS QUE EXPRESSEN GK.	63-77
2.1. OBTENCIÓ DE CÈL.LULES MUSCULARS QUE EXPRESSEN GK.	63
2.1.1. Transfecció de cèl.lules C ₂ C ₁₂ amb el gen quimèric MLC/GK.	63
2.1.2. Anàlisi de l'expressió de la GK en cèl.lules C ₂ C ₁₂ .	64
2.2. ESTUDI <i>IN VITRO</i> DELS EFECTES DE L'EXPRESSIÓ DE GK EN CÈL.LULES MUSCULARS C ₂ C ₁₂ .	65
2.2.1. Determinació de l'activitat GK.	65
2.2.2. Efecte de l'expressió de GK sobre la captació de glucosa i la producció de lactat.	67
2.3. ESTUDI <i>IN VIVO</i> DELS EFECTES DE L'EXPRESSIÓ DE GK EN CÈL.LULES MUSCULARS C ₂ C ₁₂ GK.	69
2.3.1. Trasplantament de cèl.lules C ₂ C ₁₂ GK a la cavitat peritoneal de ratolins C3H.	69
2.3.2. Reversió de la hiperglucèmia diabètica després del trasplantament de miotubs C ₂ C ₁₂ GK.	74
PART II: EXPRESSIÓ DE LA GLUCOQUINASA AL MÚSCUL ESQUELÈTIC:	
PAPER EN LA CONTRARESTACIÓ DE LA DIABETIS DE TIPUS 2.	79-110
INTRODUCCIÓ.	79-80
1. CARACTERITZACIÓ D'UN MODEL ANIMAL DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA: RATOLINS IRS-1 ^{+/-} ALIMENTATS AMB UNA DIETA ALTA EN LÍPIDS.	81-89
1.1. INDUCCIÓ DE L'ESTAT DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA EN RATOLINS IRS-1 ^{+/-} MITJANÇANT ALIMENTACIÓ AMB DIETA ALTA EN LÍPIDS.	81
1.1.1. Evolució del pes corporal.	81

1.1.2. Estudi de la glucèmia i de la insulinèmia.	82
1.1.3. Test de tolerància a la insulina.	84
1.1.4. Determinació de la leptina sèrica.	85
2. EXPRESSIÓ DE LA GK EN MÚSCUL ESQUELÈTIC DE RATOLINS IRS-1 ^{+/-} .	90-101
2.1. OBTENCIÓ DE RATOLINS IRS-1 ^{+/-} QUE EXPRESSEN GK EN MÚSCUL ESQUELÈTIC.	90
2.2. EFECTE DE L'EXPRESSIÓ DE GK EN MÚSCUL ESQUELÈTIC DE RATOLINS IRS-1 ^{+/-} SOBRE LA INDUCCIÓ DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA PER UNA DIETA ALTA EN LÍPIDS.	91
2.2.1. Evolució del pes corporal.	91
2.2.2. Estudi de la glucèmia i de la insulinèmia.	92
2.2.3. Test de tolerància a la glucosa.	94
2.2.4. Test de tolerància a la insulina.	95
2.2.5. Estudi dels nivells de leptina i adiponectina.	97
3. ELECTROTRANSFERÈNCIA <i>IN VIVO</i> DEL GEN DE LA GK A MÚSCUL ESQUELÈTIC DE RATOLINS IRS-1 ^{+/-} .	102-110
3.1. ELECTROTRANSFERÈNCIA DEL GEN DE LA GK A MÚSCUL ESQUELÈTIC DE RATOLINS GENOSUPRIMITS EN IRS-1.	102
3.1.1. Estudi de l'expressió del gen de la GK en múscul esquelètic de ratolins genosuprimits per IRS-1.	103
3.1.2. Determinació de la captació de glucosa en múscul esquelètic.	104
3.1.3. Anàlisi de la glucèmia i insulinèmia	105
3.1.4. Test de tolerància a la insulina.	106
V. CONCLUSIONS.	111-112
VI. MATERIALS I MÈTODES.	113-138
1. MATERIALS.	113-115
1.1. ANIMALS.	113
1.2. LÍNIES CEL·LULARS.	113
1.3. SOQUES BACTERIANES I VECTORS PLASMÍDICS.	113
1.4. REACTIUS I MEDIS DE CULTIU.	114
1.5. SONDES.	114
1.6. OLIGONUCLEÒTIDS.	114
1.7. ANTICOSSOS.	115

2. MÈTODES.	115-138
2.1. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE DNA.	115
2.1.1. Preparació de DNA plasmídic.	115
2.1.2. Manipulació enzimàtica del DNA.	116
2.1.3. Aïllament i purificació de fragments de DNA.	117
2.1.3.1. <i>Gels d'agarosa.</i>	117
2.1.3.2. <i>Purificació de fragments de DNA per Gene-clean.</i>	117
2.1.3.3. <i>Purificació de fragments de DNA per electroelució.</i>	117
2.1.4. Construcció de molècules híbrides de DNA.	118
2.1.4.1. <i>Subclonatge de fragments de DNA.</i>	118
2.1.4.2. <i>Transformació de cèl·lules d'E. Coli.</i>	118
2.1.5. Marcatge radioactiu del DNA.	119
2.2. TÈCNICA D'OBTENCIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS.	119
2.2.1. Preparació del DNA.	119
2.2.2. Recol·lecció dels oocits fecundats.	120
2.2.3. Preparació per a la microinjecció.	121
2.2.4. Microinjecció dels oocits fecundats.	122
2.2.5. Transferència a la femella receptora.	122
2.3. DETECCIÓ DELS ANIMALS TRANSGÈNICS.	123
2.3.1. Obtenció de DNA genòmic.	123
2.3.2. Anàlisi de DNA per Southern blot.	124
2.3.3. Establiment de les línies de ratolins transgènics.	125
2.3.4. Anàlisi de DNA per PCR.	126
2.4. PREPARACIÓ I ANÀLISI DE RNA.	126
2.4.1. Extracció de RNA total.	126
2.4.2. Electroforesi de RNA en gels desnaturalitzants d'agarosa/formaldehid.	127
2.4.3. Anàlisi de RNA per Northern blot.	127
2.5. PREPARACIÓ I ANÀLISI DE PROTEÏNA.	128
2.5.1. Extracció de proteïna total.	128
2.5.2. Obtenció de membranes totals.	128
2.5.3. Determinació de la concentració de proteïnes.	129
2.5.4. Separació de proteïnes per electroforesi SDS-PAGE.	129
2.5.5. Electrotransferència de proteïnes a membrana i immunodetecció.	130
2.6. ANÀLISI IMMUNOHISTOQUÍMICA.	130

2.7. DETERMINACIÓ DE LA CAPTACIÓ DE GLUCOSA EN MÚSCUL ESQUELÈTIC.	131
2.8. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES SÈRICS.	131
2.8.1. Determinació de glucosa.	132
2.8.2. Determinació d'insulina.	132
2.8.3. Determinació de lactat.	132
2.8.4. Determinació de triglicèrids.	133
2.8.5. Determinació d'àcids greixosos no esterificats (NEFAs).	133
2.8.6. Determinació de β -hidroxibutirat.	133
2.9. DETERMINACIÓ DE METABOLITS.	133
2.9.1. Determinació de glucogen.	133
2.10. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA.	134
2.11. TEST DE TOLERÀNCIA A LA INSULINA.	134
2.12. INDUCCIÓ DE LA DIABETIS EXPERIMENTAL MITJANÇANT STZ.	134
2.13. DETERMINACIÓ DEL CONSUM D'AIGUA I MENJAR.	135
2.14. ELECTROTRANSFERÈNCIA DE DNA A MÚSCUL ESQUELÈTIC.	135
2.15. TRANSFECCIÓ DE CÈL.LULES EN CULTIU.	135
2.16. TRACTAMENT DE CÈL.LULES EN CULTIU.	136
2.16.1. Determinació de l'activitat GK en cèl.lules en cultiu.	136
2.16.2. Anàlisis metabòliques.	137
2.16.2.1. <i>Determinació de la síntesi de glucogen.</i>	137
2.16.2.2. <i>Mètode de Bradford.</i>	138
2.17. ANÀLISI HISTOLÒGICA.	138
2.18. CÀLCULS ESTADÍSTICS.	138
VII. BIBLIOGRAFIA.	139-158

I. PRESENTACIÓ

La diabetis mellitus és una malaltia metabòlica molt freqüent, que comprèn una gran varietat de síndromes amb diferents etiologies i afecta en total a un 2-7% de la població mundial. Aquesta malaltia es caracteritza, bàsicament, per una hiperglucèmia deguda a la manca d'insulina o bé a una alteració en l'acció de l'hormona. Al nostre laboratori estem desenvolupant aproximacions per reduir la hiperglucèmia diabètica mitjançant la manipulació genètica de teixits extrapancreàtics per tal que captin glucosa. Per comprovar *in vivo* la validesa d'aquestes aproximacions hem dut a terme estudis en diferents models d'animals transgènics i genosuprimits.

El múscul esquelètic és el principal teixit implicat en la captació de glucosa sanguínia després d'una ingesta, eliminant al voltant d'un 75% del sucre. El teixit muscular capta glucosa per difusió facilitada de forma dependent i independent de la insulina. Per tant, com a conseqüència de la manca d'insulina en la diabetis tipus 1 o de la resistència a l'hormona en la diabetis tipus 2, el múscul esquelètic és incapaç de captar glucosa de la sang.

En el nostre laboratori s'havien generat ratolins transgènics que expressen l'enzim hepàtic glucoquinasa en múscul esquelètic. Aquests ratolins presenten un increment en la captació i utilització de la glucosa, però romanen hiperglucèmics en alimentació després del tractament amb STZ. Aquest fet podria ser degut a una alteració en el transport de la glucosa cap a l'interior de la cèl.lula muscular. Així, en aquest treball hem obtingut ratolins transgènics que expressen ambdós, el transportador GLUT2 i l'enzim GK, en múscul esquelètic, amb la finalitat d'incrementar el transport i la fosforilació de la glucosa. Això es va realitzar per tal d'estudiar si la coexpressió d'aquestes proteïnes resultava en una normalització de la hiperglucèmia diabètica. No obstant, els resultats obtinguts indiquen que l'expressió de GLUT2 en múscul esquelètic de ratolins MLC/GK tractats amb STZ no millora els resultats obtinguts amb ratolins que expressen únicament GK a múscul. En canvi, i contràriament als ratolins control diabètics, hem demostrat que petites dosis d'insulina exògena permeten aconseguir una normalització de la glucèmia en animals diabètics que expressen GK en múscul esquelètic.

Per altra banda, també s'han manipulat cèl.lules musculars en cultiu per tal que expressin l'enzim GK i estudiar si el transplantament d'aquestes cèl.lules a ratolins tractats amb STZ permet aconseguir una contrarrestació o una prevenció de la hiperglucèmia diabètica. Els resultats presentats en aquesta memòria mostren que els mioblasts C₂C₁₂ que expressen GK presenten un increment en la captació de glucosa

de forma dependent de la concentració extracel·lular del sucre. Així, quan aquestes cèl·lules són transplantades a ratolins tractats amb STZ, els animals presenten una disminució de la hiperglucèmia diabètica degut a un increment en la captació i utilització de la glucosa per part de l'implant. Per tant, això podria constituir una aproximació *ex vivo* per tal d'incrementar l'eliminació de glucosa sanguínia en la diabetis tipus 1.

Les causes de l'aparició de diabetis tipus 2 encara són desconegudes, però es creu que interaccionen la susceptibilitat genètica i una sèrie de factors ambientals, principalment la dieta i l'activitat física. En el present estudi hem investigat l'efecte de l'expressió de GK en múscul esquelètic de ratolins models de resistència a la insulina. Per dur a terme això hem utilitzat dues aproximacions diferents: per una banda, s'ha expressat GK en múscul esquelètic d'un model de resistència a la insulina obtingut per combinació d'una alteració genètica a la via de senyalització de l'hormona, concretament una genosupressió parcial de l'IRS-1 (IRS-1^{+/-}), juntament amb una dieta d'alt contingut en lípids. Per altra banda s'ha electrotransferit *in vivo* el gen de la GK a múscul esquelètic d'animals IRS-1^{+/-}, un model de resistència a la insulina sense obesitat prèviament descrit i caracteritzat (Araki, 1994; Tamemoto, 1994). Així, els resultats obtinguts en aquesta part de l'estudi suggereixen que l'expressió de GK en múscul esquelètic permetria una millora en la sensibilitat a la insulina en aquests dos models de resistència a l'hormona. Per tant, l'expressió de GK en múscul esquelètic també podria resultar una bona aproximació per tal d'incrementar la captació de glucosa i incrementar la sensibilitat a la insulina en la diabetis tipus 2.

II. INTRODUCCIÓ

1. HOMEÒSTASI DE LA GLUCOSA.

La glucosa és la principal font d'energia per a les cèl·lules. La concentració extracel·lular del sucre es manté dins d'un rang normal mitjançant un equilibri entre el flux de glucosa dintre i fora de l'espai extracel·lular, degut a la secreció coordinada d'insulina i glucagó (Unger, 1991; DeFronzo, 1997).

En estat de dejuni, la captació de la glucosa té lloc principalment en teixits no dependents d'insulina, especialment en cervell. La captació basal de la glucosa es manté en equilibri amb la producció de glucosa per part del fetge a través de la gluconeogènesi i de la glucogenòlisi. Durant la ingesta, el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa depèn de tres processos que es poden donar simultàniament: 1) En resposta a l'augment de la concentració plasmàtica de glucosa, s'estimula la secreció d'insulina per part de les cèl·lules β del pàncrees 2) La combinació de l'increment en la glucèmia i en la insulinèmia promou la captació de glucosa pels teixits esplàncics (fetge) i perifèrics (múscul, teixit adipós) 3) La inhibició de la secreció de glucagó induïda per insulina suprimeix l'alliberació hepàtica de glucosa. Així, alteracions funcionals a nivell de les cèl·lules β , del fetge, del múscul i del teixit adipós poden conduir a un trastorn en l'homeòstasi de la glucosa i al desenvolupament d'intolerància a la glucosa o, fins i tot, a diabetis mellitus no dependent d'insulina (o diabetis de tipus 2) (DeFronzo, 1997).

Per tal de poder ser utilitzada com a font d'energia, la glucosa ha de ser transportada a l'interior de la cèl·lula i fosforilada a glucosa-6-fosfat. El transport facilitat de la glucosa es realitza mitjançant una família de proteïnes transportadores, la família dels GLUTs, i la seva fosforilació la porten a terme un grup de proteïnes anomenades hexoquinases. La glucosa-6-fosfat resultant podrà ser utilitzada a través de les diferents vies metabòliques, com la glucòlisi, la via de les pentoses, o bé, podrà ser emmagatzemada en forma de glucogen.

2. EL TRANSPORT DE LA GLUCOSA.

La capacitat de transportar glucosa a través de la membrana plasmàtica és una característica comú de gairebé totes les cèl·lules, des d'un simple bacteri fins a cèl·lules altament especialitzades com ara les neurones. Aquest transport el realitzen membres de dues famílies de proteïnes integrals de membrana, estructural i funcionalment diferents: 1) els co-transportadors de glucosa sodi-dependents, SGLT (membres d'una família més gran de transportadors Na^+ -dependents anomenada SLC5A) (Wright, 2001); 2) els transportadors de sucres Na^+ -independents (família GLUT, nom gènic SLC2A) (Mueckler, 1994; Joost and Thorens, 2001).

2.1. TRANSPORTADORS DE GLUCOSA SODI-DEPENDENTS.

Els transportadors sodi-dependents SGLT transporten glucosa i galactosa amb diferents afinitats, mitjançant transport actiu secundari. El gradient electroquímic de sodi creat per la bomba ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ és utilitzat per transportar glucosa dins les cèl·lules contra la seva concentració de gradient. Això es dona al lumen de l'intestí prim i als túbuls proximals dels ronyons. La primera d'aquest tipus de proteïnes transportadores de glucosa que va ser clonada és el transportador d'alta afinitat SGLT1 (Hediger, 1987). SGLT1 presenta expressió tissular limitada i es troba essencialment a les membranes apicals de cèl·lules absorbives de l'intestí prim (enteròcits) i als túbuls proximals renals (cèl·lules S3). Mutacions en el transportador SGLT1 humà provoquen malabsorció de glucosa i galactosa, una condició neonatal potencialment fatal (Turk, 1991). Això es pot corregir per reemplaçament de la glucosa de la dieta amb fructosa.

Un segon transportador, SGLT2, és de baixa afinitat i s'expressa bàsicament a la membrana apical dels túbuls proximals renals (cèl·lules S1 i S2) (Wells, 1992; Kanai, 1994). S'accepta que, a ronyó, SGLT2 (baixa afinitat, alta capacitat) transporta la majoria de la glucosa plasmàtica des del filtrat glomerular. La glucosa remanent és recuperada per SGLT1 (alta afinitat, baixa capacitat), evitant així la pèrdua de glucosa per la orina.

Al llarg d'aquests anys les dades obtingudes amb clonatge per homologia i amb el Projecte Genoma Humà indiquen la presència de membres addicionals d'aquesta família

de transportadors, que s'estan investigant actualment. S'han assignat transportadors SGLT3-6, però encara manca una caracterització funcional i estructural completa.

2.2. TRANSPORT FACILITAT DE GLUCOSA.

El transport de glucosa a favor de gradient de concentració és mediat per una família de transportadors de glucosa anomenats GLUTs (GLUcose Transporters), que estan presents en les membranes de totes les cèl·lules (Burant, 1991; Pessin i Bell, 1992; Thorens, 1993). El transport facilitat de glucosa és saturable, estereoselectiu i bidireccional (Wright, 1993).

El primer transportador aïllat, GLUT1, va ser clonat a partir de la línia cel·lular HepG2 (Mueckler, 1985). Posteriorment es van identificar altres membres de la família GLUT per donar lloc a quatre transportadors de glucosa (GLUT1-4) i un transportador de fructosa (GLUT5). Dos membres més van ser inclosos durant un breu període, però després van ser descartats. Un gen, codificant per GLUT6, va resultar ser un pseudogen (Kayano, 1990), i també es va trobar que GLUT7 era un artefacte de la seqüència (Burchell, 1998). Des d'aleshores els noms de GLUT6 i GLUT7 s'han assignat a altres productes gènics (veure Taula I).

Durant els darrers anys s'han identificat i descrit diversos gens que codifiquen per proteïnes de la família dels transportadors de glucosa. Degut a la seva similitud de seqüència amb el transportador GLUT1, sembla que aquests gens també pertanyen a la família SLC2A (solute carriers 2A), de símbol proteic GLUT (Joost and Thorens, 2001). De fet, s'han identificat 8 membres més de la família GLUT, i s'ha arribat a un consens pel qual els tretze membres finals s'han anomenat GLUT1-12 i HMIT (H⁺-coupled myo-inositol transporter) (Joost and Thorens, 2001).

Les característiques generals d'aquests transportadors les podríem resumir en: 1) tots transporten glucosa, encara que amb eficiències i cinètiques diferents; 2) presenten una expressió específica de teixit tot i que en un mateix tipus cel·lular sovint podem trobar l'expressió de dues o més isoformes (Taula I); 3) l'expressió d'aquests transportadors és regulada pel procés de desenvolupament embrionari, però també poden ser regulats per factors endògens com hormones i factors de creixement.

Taula I: Família dels transportadors de glucosa (GLUT) o transportadors de sucres i poliols (SLC2A)

Isoforma	Nom anterior	Classe	Localització tissular	Sensible a insulina?	Característiques funcionals (transport)	Present a múscul esquelètic?	Present a WAT?
GLUT1	-	I	Eritròcits, cervell, ubiqua	No	Glucosa	Sí	Sí
GLUT2	-	I	Fetge, pàncrees, intestí, ronyó	No	Glucosa (baixa afinitat) fructosa	No	No
GLUT3	-	I	Cervell	No	Glucosa (alta afinitat)	No	Sí (mRNA)
GLUT4	-	I	Cor, múscul, WAT, BAT, cervell	Sí	Glucosa (alta afinitat)	Sí	Sí
GLUT5	-	II	Intestí, testicles, ronyó	No	Fructosa; glucosa (molt baixa afinitat)	Sí	Sí
GLUT6	GLUT9	III	Cervell, melsa, leucòcits	No	Glucosa	No	n.d.
GLUT7	-	II	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GLUT8	GLUTX1	III	Testicles, cervell, altres teixits	No (si en blastocist)	Glucosa	Sí (mRNA)	Sí (mRNA)
GLUT9	GLUTX	II	Fetge, ronyó	n.d.	n.d.	No	n.d.
GLUT10	-	III	Fetge, pàncrees	No	Glucosa	Sí (mRNA)	n.d.
GLUT11	GLUT10	II	Cor, múscul	No	Glucosa (baixa afinitat) Fructosa (forma llarga)	Sí (mRNA)	No
GLUT12	GLUT8	III	Cor, pròstata, múscul, intestí prim, WAT	Sí	n.d.	Sí	Sí
HMIT	-	III	Cervell	n.d.	H ⁺ -mioinositol	No	Sí (mRNA)

La característica estructural principal d'aquestes proteïnes és la presència de 12 segments transmembrana α -hèlix connectats per segments hidrofílics, tal i com es pot predir segons l'anàlisi hidropàtica (Mueckler, 1985). Els extrems amino i carboxiterminal es localitzen a nivell intracel·lular.

D'altra banda, sembla ser que l'extrem carboxiterminal determina la localització cel·lular del transportador després de la seva síntesi. Cadascuna de les isoformes presenta funcions específiques en els teixits on s'expressen degut a les diferents propietats fisiològiques i bioquímiques. Les isoformes es diferencien principalment en la seva afinitat per la glucosa.

Les comparacions de seqüència dels diferents membres d'aquesta família de transportadors han permès trobar, també, les següents característiques comuns: 1) set residus de glicina conservats a les hèlixs transmembrana, 2) diversos residus àcids i bàsics a la superfície intracel·lular de les proteïnes, 4) dos residus de triptòfan conservats, i 5) dos residus de tirosina conservats (Joost and Thorens, 2001).

En base a la similitud de seqüències i elements característics, l'extensa família dels GLUTs pot ser dividida en tres subfamílies: 1) classe I, que inclou els primers transportadors coneguts, GLUT1-4, 2) classe II, formada pel transportador de fructosa GLUT5 i els transportadors posteriorment identificats GLUT7, GLUT9 i GLUT11, i 3) classe III, formada per GLUT6, 8, 10, 12 i el transportador de mio-inositol HMIT1 (Joost and Thorens, 2001).

2.2.1. Transportadors de classe I.

La classe I de transportadors passius de glucosa comprèn els GLUT1-4, que han estat extensament caracteritzats en quant a estructura, funció i distribució tissular.

El transportador GLUT1 presenta una elevada afinitat per la glucosa i una K_m de 3 mM. L'expressió d'aquest transportador a la majoria de les cèl·lules els permet assegurar-se un aport mínim de glucosa. GLUT1 s'expressa particularment en cervell (incloent la barrera hemato-encefàlica) i en eritròcits. També s'han trobat nivells d'expressió moderats en teixit adipós, múscul i fetge.

El transportador GLUT2 es caracteritza per la seva baixa afinitat per la glucosa i la seva elevada Km (15 mM). Aquesta característica li confereix una alta capacitat de transport, directament proporcional a la concentració fisiològica del sucre.

La isoforma GLUT3 es troba en diferents tipus cel·lulars, però és el transportador més abundant en cèl·lules neuronals. Aquest transportador té una Km per la glucosa molt baixa (1mM), la qual cosa permet l'entrada de glucosa dins la neurona fins i tot en condicions d'hipoglucèmia molt marcada. Per tant, l'elevada afinitat de GLUT3 per la glucosa és consistent amb la seva presència en teixits on la demanda de glucosa com a font d'energia és considerable, en particular en cervell.

El transportador GLUT4 té una Km del voltant de 5 mM, i es diferencia de la resta d'isoformes perquè en absència d'insulina no es troba a la superfície cel·lular, sinó que es localitza en vesícules intracel·lulars. GLUT4 es troba en cor, múscul esquelètic i teixit adipós, on és responsable de la reducció en l'elevació postprandial dels nivells de glucosa plasmàtica, i també s'ha trobat en cervell (Rayner, 1994). La insulina actua estimulant la translocació de les vesícules de GLUT4 des de la seva localització intracel·lular a la membrana plasmàtica, donant com a resultat un increment immediat de 10-20 vegades en el transport de glucosa (Shepherd and Kahn, 1999; Bryant, 2002). Models animals de genosupressió global o específica de teixit en GLUT4 mostren un grau variable de patofisiologia relacionada amb la diabetis tipus 2 (Stenbit, 1997; Kim, 2001). S'ha suggerit que, entre altres factors, l'expressió de transportadors de glucosa addicionals, però desconeguts, podria tenir un paper en aquest fenomen. Per tant, encara cal demostrar si intervé l'expressió compensatòria dels membres de la família GLUT més recentment identificats.

2.2.2. Transportadors de classe II.

Els transportadors passius de classe II estan encapçalats pel transportador de fructosa GLUT5, i inclouen GLUT7, GLUT9 (cap dels quals ha estat caracteritzat funcionalment) i GLUT11.

El transportador GLUT5 es localitza principalment en la membrana apical dels enteròcits intestinals, en testicles i en ronyons, i és la via principal de captació de fructosa de la

dieta. També s'expressa, en elevada concentració, a la membrana plasmàtica de l'espermatozou.

GLUT7 és el membre menys conegut de la família, i no es coneixen els llocs on s'expressa normalment (Joost and Thorens, 2001). L'expressió de GLUT9 és evident en fetge i ronyons. Pel que fa a GLUT11, s'han descrit dues variants d'*splicing* que donen com a resultat una forma llarga i una forma curta de la proteïna, de 503 i 493 aminoàcids respectivament (Doege, 2001; Sasaki, 2001). La forma curta de GLUT11 està implicada en transport de glucosa de baixa afinitat i s'expressa predominantment en cor i múscul esquelètic. La forma llarga de GLUT11 es troba en fetge, pulmons, tràquea i cervell, i s'ha demostrat que és capaç de transportar fructosa.

2.2.3. Transportadors de classe III.

La classe III de transportadors passius comprèn cinc membres: GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 i HMIT. Una característica d'aquesta classe és la localització del lloc de glicosilació característic al *loop* 9. Aquest lloc de glicosilació, que ha resultat ser funcionalment important per al GLUT1 (Asano, 1991), es troba al *loop* 1 en les altres dues classes de transportadors. Una segona característica és que tots els membres d'aquesta classe (i també GLUT7 i GLUT9) contenen motius diana de localització. GLUT6, GLUT8 i GLUT12 semblen ser regulats per redistribució subcel·lular, ja que són dirigits a compartiments intracel·lulars degut a motius dileucina presents al seu extrem N-terminal (Joost and Thorens, 2001; Rogers, 2002). En el cas de GLUT6 i GLUT8, s'ha vist que el tractament amb insulina no indueix la translocació de la proteïna a la superfície cel·lular (Lisinski, 2001). El significat d'aquests i altres motius de localització en aquest grup encara està per determinar.

GLUT6 s'expressa en melsa, leucòcits i cervell; GLUT8 es troba a testicles, cervell i teixit adipós; GLUT10 s'expressa a múscul esquelètic, cor, fetge i pàncrees; GLUT12 en cor, intestí prim, pròstata i teixits sensibles a insulina; i HMIT s'expressa principalment a cervell. S'ha demostrat transport funcional de glucosa per a GLUT6, GLUT8 i GLUT10. HMIT és un transportador de mioinositol acoblat al transport de protons (Wood and Trayhurn, 2003).

2.3. EL TRANSPORTADOR GLUT2.

Aquesta isoforma és la majoritària en el fetge, les cèl·lules β pancreàtiques, i les cèl·lules de l'epiteli absortiu de la mucosa intestinal i del ronyó (Thorens , 1988; Thorens, 1992a i b; Thorens, 1993). S'ha clonat la isoforma GLUT2 d'humans, de rata i de ratolí. Les proteïnes codificades tenen entre 522 i 524 aminoàcids i són idèntiques en més d'un 80%. Té un 55% d'identitat amb GLUT1, essent especialment divergents en la zona de l'extrem C-terminal i en la zona extracel·lular que connecta els segments transmembrana 1 i 2. Sembla unir forskolina i citocalassina B, encara que amb menys afinitat que GLUT1 (amb una Kd al voltant d'1 micromolar). Les seves característiques cinètiques el fan molt particular, ja que té una Km per a la glucosa al voltant de 20 mM. A més, transporta fructosa amb una Km d'aproximadament 100 mM.

En les cèl·lules epitelials, GLUT2 s'expressa exclusivament a la membrana basolateral, on treballa de manera coordinada amb el transportador de glucosa sodi-dependent, expressat en la membrana apical, per tal d'intervenir en l'absorció o reabsorció de glucosa del lumen intestinal o de l'orina que s'està formant. En les cèl·lules hepàtiques i en les cèl·lules β pancreàtiques, GLUT2 forma conjuntament amb la glucoquinasa (isoenzim de l'hexoquinasa que també té una Km per a la glucosa molt alta), un sensor per a la concentració circulat de glucosa. Aquest sensor respon a canvis en la concentració de glucosa circulat (siguin grans o petits) amb canvis proporcionals en la quantitat de glucosa transportada, gràcies a l'elevada Km del conjunt transportador-glucoquinasa. En el fetge, aquest sistema serveix per controlar la concentració de glucosa circulat, bé captant-la (en estats d'anabolisme), bé alliberant la produïda en la gluconeogènesi o glucogenolisi (en estats catabòlics). En les cèl·lules β pancreàtiques, la síntesi i secreció d'insulina depenen de la captació i posterior metabolisme de la glucosa.

3. LA FOSFORILACIÓ DE LA GLUCOSA.

El primer pas en el metabolisme de la glucosa en cèl·lules de mamífer és la transferència d'un grup fosfat des de l'ATP a la posició 6 de la molècula de glucosa. Aquesta reacció és catalitzada per les hexoquinases (HK) (ATP:hexosa 6-fosfotransferases, EC 2.7.1.1.), que constitueixen una família d'enzims relacionats evolutivament i estructuralment, i que estan presents en totes les cèl·lules eucariotes, des dels llevats fins als mamífers. Cadascun dels isoenzims presenta un tamany, propietats cinètiques i distribució tissular diferents (Katzen i Schimke, 1965). Els teixits dels mamífers presenten 4 tipus d'hexoquinases (I, II, III i IV), classificades en funció de la seva mobilitat electroforètica. Les hexoquinases I-III comparteixen moltes propietats comuns: el seu pes molecular de 100 KDa, una elevada afinitat per la glucosa i uns valors de Km entre 20-130 micromolar. A més, les seves activitats són inhibides mitjançant un mecanisme *feed-back* per concentracions fisiològiques de glucosa-6-fosfat. L'HKI s'expressa en la majoria de teixits, però d'una manera més elevada en ronyó i cervell. L'HK predominant en els teixits sensibles a la insulina (múscul esquelètic i adipòcits) és HKII. La seva activitat està incrementada per l'acció de la insulina mitjançant un increment en l'expressió del seu gen. L'HKII possibilita, juntament amb el GLUT4, la captació de glucosa estimulada per insulina. L'HKIII s'expressa de forma constitutiva però es troba en baixes quantitats en alguns teixits.

L'hexoquinasa IV o glucoquinasa (GK) és estructuralment i funcionalment diferent de la resta d'hexoquinases. El seu pes molecular és de 52 KDa i presenta una baixa afinitat per la glucosa, cosa que assegura que la velocitat de fosforilació del sucre sigui proporcional als nivells de glucosa sanguínia i a la concentració cel·lular de l'enzim. A més, la GK no és inhibida per concentracions fisiològiques de glucosa-6-fosfat (Weinhouse, 1976). També, mostra una cinètica cooperativa (sigmoïdal) respecte a la concentració de glucosa, que depèn de la concentració d'ATP (Cardenas, 1997).

S'ha suggerit que els transportadors de glucosa i les hexoquinases podrien formar complexos de multisubunitats per canalitzar el transport i la fosforilació en funció de les exigències metabòliques de cada teixit (Bell, 1993). Així doncs, cadascuna de les isoformes podria coexpressar-se amb un transportador de glucosa específic formant un complex, com per exemple l'hexoquinasa I i el GLUT1, l'hexoquinasa II i el GLUT4, o la glucoquinasa i el GLUT2. La manera en què aquests dos processos estan acoblats, en

funció de la concentració intracel·lular de glucosa, sembla ser crucial en la utilització específica de la glucosa en cada teixit (Printz, 1997).

3.1. L'ENZIM GLUCOQUINASA.

La glucoquinasa (GK) és l'hexoquinasa predominant en les cèl·lules parenquimals del fetge i en les cèl·lules β del pàncrees. També està present en cèl·lules neuroendocrines del tracte gastrointestinal i en la pituitària anterior (Hughes, 1991; Liang, 1991). A més, s'ha descrit la seva presència en cèl·lules alfa i delta dels illots de Langerhans (Heimberg, 1996; Toyoda, 1997).

3.1.1. Característiques cinètiques i funcions específiques de la glucoquinasa.

Les propietats cinètiques de la GK i la seva regulació permeten que aquest enzim tingui un significat funcional molt important en el fetge i la cèl·lula β pancreàtica (Pilkis i Granner, 1992; Postic, 2001). La fosforilació de glucosa dins la cèl·lula β , que és un punt clau del control del flux glucolític, es troba fortament acoblada a la secreció d'insulina (Liang, 1992; Wang and Lynedjian, 1997). La cinètica única de la GK és responsable de la capacitat d'aquestes cèl·lules de detectar i respondre a les fluctuacions en la concentració de glucosa plasmàtica. En conseqüència, fins i tot petits canvis en l'activitat de la GK poden ser fisiològicament significatius, i afectar directament el llindar de la secreció d'insulina estimulada per glucosa. Degut a això, la GK es considera com el "sensor de glucosa" de la cèl·lula β (Meglasson and Matschinsky, 1984).

S'estan investigant els mecanismes de sensibilitat a la glucosa en altres tipus cel·lulars, apart de les cèl·lules β , que presenten canvis funcionals en resposta a alteracions en la concentració de glucosa a la qual es troben exposades. Per exemple, s'ha demostrat que certes cèl·lules de l'hipotàlem i l'estómac són, també, sensibles a glucosa, tot i que els mecanismes bioquímics implicats encara no es coneixen. La identificació de l'expressió gènica de GK en aquests llocs porta a suggerir que la glucoquinasa també funciona com a sensor de glucosa en totes o algunes d'aquestes cèl·lules, tal com fa a la cèl·lula β (Postic, 2001).

Al fetge, la GK és essencial per les funcions metabòliques pròpies d'aquest teixit. S'ha establert que la GK hepàtica exerceix una gran influència en la utilització de glucosa i la síntesi de glucogen. Fins i tot petits canvis en l'expressió de GK en animals transgènics porten a un canvi mesurable en la concentració de glucosa sanguínia (Ferré, 1996a).

El flux metabòlic al fetge reflexa les activitats netes de diverses vies importants. Els enzims d'aquestes vies (com per exemple la piruvat quinasa, l'àcid gras sintasa i el transportador GLUT2) estan regulats a nivell transcripcional pel metabolisme de la glucosa (Girard, 1997). A més, la GK, mitjançant la regulació de gens implicats en el metabolisme dels àcids grassos, juga un paper important en la lipogènesi hepàtica (Girard, 1997).

3.1.2. Regulació transcripcional i post-traducciona de la GK.

Hi ha dos aspectes molt importants en la regulació de la GK. La primera d'aquestes característiques és l'existència de dos promotors separats i funcionalment diferents que regulen l'expressió a nivell transcripcional. Aquests promotors alternatius porten a la producció d'isoformes de GK específiques de teixit, que difereixen en les seqüències N-terminals (Magnuson, 1990). En segon lloc, a més de ser regulada a nivell de transcripció gènica, la GK és regulada a nivell post-traducciona per unió a la proteïna reguladora de la GK (GKRP) (Van Schaftingen, 1989).

El gen de la GK és un gen de seqüència única que conté 11 exons. Tant a fetge com a pàncrees, els exons 2-10 són idèntics, però no succeeix el mateix amb el primer exó. En el fetge, l'exó 1 (1L) està situat adjacent a la resta d'exons mentre que en la cèl·lula β l'exó 1 (1 β) està situat a més de 25 Kb en posició 5' respecte al següent exó (lynedjian, 1993). Aquesta divergència es tradueix en una diferència de 15 aminoàcids entre les dues proteïnes. Els 11 exons del gen s'extenen al llarg de 49 kb, la majoria de les quals corresponen a 35 kb de DNA entre els exons 1 β i 1L. La seqüenciació del gen de la GK va revelar que la GK murina és més del 94% idèntica a les GK de rata i humana. També s'han trobat regions evolutivament molt conservades a les zones dels promotors de la GK, però les seves funcions encara no estan del tot establertes.

Posteriorment, s'han fet estudis que han demostrat que el promotor distal, funcional a les cèl·lules β , també s'expressa en cèl·lules corticotròpiques de la pituitària, així com en

certes cèl·lules neurals/neuroendocrines (NE) del cervell i l'estòmac (Hughes, 1991; Jetton, 1994, 1998).

Al fetge, la transcripció del gen de la GK és estimulada per la insulina i inhibida pel glucagó mitjançant la via del cAMP (Iynedjian, 1989; Magnuson, 1989). La insulina estimula la síntesi de GK i la seva acció no depèn de la concentració de glucosa extracel·lular. En rates diabètiques on la transcripció del gen de la GK està disminuïda, l'administració d'insulina incrementa 20 vegades la transcripció del gen en els 45 minuts següents (Iynedjian, 1988; Magnuson, 1990). El glucagó, via cAMP, té l'efecte contrari i, a més, aquest efecte inhibidor és dominant sobre l'efecte estimulador de la insulina.

Els nivells d'activitat GK en el fetge de rata i d'altres mamífers varien segons l'estat nutricional de l'animal. L'activitat GK disminueix durant el dejuni i es restableix amb la realimentació (Iynedjian, 1993). Existeixen canvis molt marcats en la quantitat de RNA missatger (mRNA) en aquestes condicions (Iynedjian, 1987). En canvi, en els illots de Langerhans els nivells de mRNA es mantenen constants durant el dejuni perllongat.

S'ha descrit que la GK és inhibida per àcids grassos de cadena llarga (Iynedjian, 1993). L'efecte inhibidor és immediat, però reversible instantàniament (Tippett i Neet, 1982a). Estudis cinètics suggereixen que l'àcid palmític i l'àcid oleic s'uneixen al·lostèricament a la molècula de GK produint un canvi conformacional en l'enzim que fa disminuir la seva afinitat per la glucosa (Tippett i Neet, 1982b). La inhibició de l'activitat GK per àcids grassos podria ser significativa *in vivo* en situacions on hi ha un augment important en la lipòlisi, com, per exemple, durant el dejuni o en la diabetis mellitus (Iynedjian, 1993).

Un altre mecanisme de la regulació a curt termini de l'activitat GK és mitjançant la proteïna reguladora de la glucoquinasa (GKRP), que té una massa molecular de 68 KDa (Van Schaftingen, 1992). La interacció entre la GK i la GKRP al fetge té un efecte tant sobre l'activitat com sobre la localització subcel·lular de l'enzim (Van Schaftingen, 1989; Vandercarmmen and Van Schaftingen, 1990; de la Iglesia, 1999; Shiota, 1999). La GKRP presenta dues conformacions diferents. Una d'aquestes conformacions (R) és capaç d'unir-se a la GK i inhibir-la, mentre que l'altra conformació (R') no s'uneix a la GK, restant aquesta activa. La fructosa-6-fosfat s'uneix a la conformació R i la fructosa 1-fosfat a la conformació R'. La proteïna reguladora unida a la fructosa-6-fosfat s'uneix a la GK i la

inhibeix de forma competitiva respecte a la glucosa. Així, l'afinitat de la GK per la glucosa canvia quan interacciona amb la proteïna reguladora. La fructosa-1-fosfat antagonitza aquesta inhibició causant la dissociació del complex GK-proteïna reguladora. S'ha descrit que l'àcid palmític també pot inhibir la GK de manera competitiva i sembla ser que el lloc d'unió de l'àcid palmític i de la proteïna reguladora és el mateix (Detheux, 1993). En hepatòcits, tot i que la proteïna reguladora es troba en concentracions suficients per inhibir tota l'activitat GK, aquesta inhibició és incompleta (aproximadament d'un 70%), possiblement per la interacció del fòsfor inorgànic sobre aquest complex. Això produeix un efecte sobre l'ús hepàtic de la glucosa i probablement també sobre la capacitat de resposta i la sensibilitat de l'hepatòcit a canvis en la concentració de glucosa (de la Iglesia, 2000). S'ha vist que animals genosuprimits en GKRK presenten una tolerància a la glucosa alterada i menys GK que els animals normals que tenen la proteïna (Grimsby, 2000). Per tant, la unió de la GK a la GKRK podria protegir-la de la degradació, proporcionant un reservori de proteïna que pot ser mobilitzada ràpidament després d'una ingesta. També s'ha observat que la GKRK és necessària per a la translocació de la GK cap al nucli, i que l'enzim conté una seqüència d'exportació nuclear que li permet retornar cap al citoplasma després de la dissociació de GKRK al nucli (Shiota, 1999). Tot i això, encara no està clar com la unió de la GK a GKRK estimula el moviment del complex dimèric cap al nucli. La proteïna reguladora també es troba en la cèl·lula beta, però es desconeix el seu paper en la regulació de la GK (Printz, 1993).

3.1.3. Efectes de la sobreexpressió de GK en fetge de ratolins.

Inicialment, es van realitzar estudis que sobreexpressen la GK específicament al fetge (Ferré, 1996a i 1996b; Hariharan, 1997). Aquests treballs han confirmat una implicació directa de la GK hepàtica en el manteniment de la concentració plasmàtica basal de glucosa. A més, també han demostrat que l'increment de GK hepàtica per si sol és capaç d'incrementar la taxa de captació de glucosa pel fetge sense incrementar la secreció d'insulina. També s'ha trobat que la GK hepàtica juga un paper important en el control de la síntesi de glucogen al fetge.

A més, s'han realitzat estudis sobre l'efecte de l'increment de l'expressió de GK en l'homeòstasi de la glucosa mitjançant la generació de ratolins transgènics que contenen còpies addicionals del locus gènic de la GK complet (Niswender, 1997). Aquests animals

mostraven una reducció en la concentració de glucosa plasmàtica i un increment en l'eliminació de glucosa en condicions basals, sense diferències en les concentracions d'insulina. Això demostrava clarament un paper per a la GK en la determinació de la taxa basal de captació de glucosa.

Mitjançant la sobreexpressió de GK en cèl·lules d'hepatoma (Valera, 1994) o en hepatòcits en cultiu utilitzant adenovirus recombinants (O'Doherty, 1996) així com en fetge de rata (O'Doherty, 1999) s'ha confirmat el paper directe de la GK hepàtica sobre la captació hepàtica de glucosa i, conseqüentment, sobre el manteniment de la concentració basal de glucosa plasmàtica.

S'ha descrit que l'increment provocat pel tractament amb STZ en les concentracions sèriques de glucosa, triglicèrids, 3-hidroxiacetil-CoA i àcids grassos lliures és menor en ratolins que sobreexpressen l'enzim GK (Ferré, 1996b). Aparentment, la sobreexpressió de GK sembla prevenir el desenvolupament de diabetis tipus 2 mitjançant una reducció de la concentració de glucosa sanguínia. Ratolins transgènics que sobreexpressen GK són resistents al desenvolupament de la hiperglucèmia i la hiperinsulinèmia associades a l'alimentació amb una dieta alta en lípids (Shiota, 2001). Es creu que aquesta resistència al desenvolupament d'obesitat podria ser deguda principalment a un increment en l'activitat de la GK hepàtica, que provocaria un increment en la utilització hepàtica de glucosa i en la síntesi de glucogen, especialment en resposta a hiperglucèmia (Niswender, 1997). No obstant, estudis recents del nostre laboratori indiquen que la sobreexpressió a llarg termini de l'enzim GK incrementa la lipogènesi hepàtica i els lípids circulants, la qual cosa porta a l'aparició de resistència a la insulina (Ferré, 2003). Aquests resultats demostren que el fetge juga un paper clau en el desenvolupament de la diabetis.

4. LA DIABETIS MELLITUS.

La diabetis mellitus és una malaltia caracteritzada per la incapacitat de l'organisme de regular correctament la glucosa sanguínia, com a conseqüència de la manca d'insulina o per la incapacitat de l'hormona d'actuar eficientment en els teixits diana, com el múscul, el fetge o el teixit adipós. La diabetis mellitus és una de les malalties metabòliques més freqüents en clínica humana. Inclou un ampli ventall de patologies amb diferents etiologies que arriben a afectar d'un 2 a un 7% de la població mundial. Totes les formes de diabetis es caracteritzen pel desenvolupament de patologia microvascular en la retina i en ronyó i de complicacions neurològiques. La diabetis també incrementa el risc de desenvolupament d'arteriosclerosi prematura i augmenta la mortalitat per infart de miocardi, malaltia cerebrovascular i vascular perifèrica (Pickup i Williams, 1994). Es diferencien clínicament dos tipus de diabetis: la diabetis de tipus 1 i la diabetis de tipus 2. La diabetis de tipus 1 és causada per una manca d'insulina degut a la destrucció de les cèl·lules β del pàncrees, mentre que la diabetis de tipus 2 és causada per la combinació d'una resistència a l'acció de la insulina i una inadequada resposta compensatòria de la secreció de l'hormona (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997).

4.1. LA DIABETIS DE TIPUS 1.

La diabetis de tipus 1 (diabetis mellitus dependent d'insulina) afecta d'un 5 a un 10% de la població diabètica. Es manifesta generalment abans dels 30 anys, freqüentment durant l'adolescència, i és el resultat de la destrucció autoimmune de les cèl·lules β dels illots de Langerhans del pàncrees, donant com a resultat hiperglucèmia i cetoacidosi. Això és degut a la incapacitat dels teixits perifèrics (múscul, teixit adipós) i del fetge de metabolitzar la glucosa. D'altra banda, al fetge s'activa la via gluconeogènica i glucogenolítica, contribuint mitjançant la producció i alliberació de glucosa a augmentar encara més els nivells de glucosa sanguínia. Els pacients diabètics necessiten obtenir energia d'altres substrats, i com a font alternativa d'energia utilitzen els cossos cetònics provinents de l'oxidació al fetge d'àcids greixosos lliures mobilitzats des del teixit adipós. Aquesta producció de cossos cetònics és la que dona com a resultat la cetoacidosi característica de la malaltia. Els símptomes característics de la malaltia són: un increment de la ingesta (polifàgia) i de la set (polidípsia), una diuresi osmòtica (poliúria) i una pèrdua

de pes. Altres alteracions inclouen la hipertrigliceridèmia, alteració del sistema renina-angiotensina, funció leucocitària alterada, etc (Pickup, 1997).

La diabetis de tipus 1 és deguda a la deficiència d'insulina com a resultat de la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques. Els símptomes de la malaltia apareixen quan ja s'ha donat una destrucció d'aproximadament el 90% de les cèl·lules β . Les cèl·lules α , productores de glucagó, les δ , productores de somatostatina, i les PP, productores de polipèptid pancreàtic, normalment es preserven, tot i que solen patir una redistribució dins l'estructura de l'illot pancreàtic.

En la patogènesi de la diabetis de tipus 1 hi ha implicats factors ambientals que activarien mecanismes autoimmunitaris en individus genèticament susceptibles, provocant la destrucció progressiva de les cèl·lules β pancreàtiques (Zimmet, 2001). Aquesta predisposició genètica és deguda a la interacció d'un conjunt de gens entre ells mateixos i amb l'ambient. Estudis genètics indiquen que en la susceptibilitat a desenvolupar la malaltia és particularment important el complex major d'histocompatibilitat (HLA), situat al cromosoma 6. S'han descrit diversos loci que estan implicats en la predisposició i/o acceleració del desenvolupament de la malaltia (Freiesleben De Blasio, 1999), com ara els diferents loci que codifiquen per MHC, referits col·lectivament com *IDDM1* (Todd, 1996). Estudis amb bessons, individus genèticament idèntics, demostren que els factors ambientals també participen en l'aparició de diabetis de tipus 1. Hi ha dades epidemiològiques que donen suport a la idea que diversos factors ambientals poden iniciar o accelerar la progressió de la malaltia. De particular interès ha estat l'estudi del paper que juguen les infeccions, les substàncies químiques i els nutrients (Haverkos, 1997).

En els pacients amb diabetis de tipus 1 és imprescindible la teràpia substitutòria amb insulina, no només per controlar la hiperglucèmia sinó també per evitar la cetosi espontània, que podria dur a un coma diabètic o, fins i tot, a la mort de l'individu. Això no evita, però, que molts dels pacients acabin desenvolupant el conjunt de complicacions secundàries associades a la diabetis: alteracions microvasculars en ronyó i retina, alteracions macrovasculars i complicacions neurològiques.

4.2. LA DIABETIS DE TIPUS 2.

La diabetis de tipus 2 és la més comú, amb una incidència que afecta del 90 al 95% de la població diabètica. Es manifesta en individus adults, normalment majors de 40 anys, i no és deguda a cap atac immunitari, sinó que inclou una sèrie de patologies amb característiques comuns. No es caracteritza per una manca d'insulina, si més no en els estadis inicials, sinó per la incapacitat de l'hormona d'actuar eficientment en teixits diana com el múscul, el fetge, o el teixit adipós, juntament amb un defecte en la secreció de l'hormona.

Les causes implicades en el desenvolupament de diabetis de tipus 2 encara són desconegudes. Existeixen evidències que suggereixen una interrelació complexa entre un o més locus genètics i diversos factors ambientals (en particular la dieta i l'activitat física) que conduïrien a una disfunció de la cèl·lula β de forma que no es podria alliberar la insulina de manera regulada en resposta a la glucosa. És difícil determinar quins defectes són primaris i quins són conseqüències secundàries dels canvis metabòlics. En la diabetis de tipus 2 es produeix una resistència a la insulina per part dels teixits perifèrics que condueix a una disminució en la captació i utilització de glucosa per part d'aquests teixits, i a un increment en la producció hepàtica de glucosa. Les causes moleculars de la resistència a l'hormona són diverses i només es coneixen parcialment. S'ha descrit que la disminució en el nombre de receptors d'insulina i mutacions en el propi receptor poden alterar la seva afinitat per la hormona. També podrien causar resistència les alteracions a nivell post-receptor, que podrien afectar a la via de transducció de senyal de la insulina (Bell, 2001). D'altra banda, cal considerar també les alteracions dels mecanismes de transport i posterior metabolització de la glucosa.

Existeix un subtipus de diabetis de tipus 2 anomenada MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) caracteritzada per la seva aparició en la primera o segona dècada de vida i que presenta una herència autosòmica dominant. Aquest subtipus de diabetis és el resultat de mutacions en diferents gens. Fins ara s'han descrit mutacions en els cromosomes 20 (MODY1), 17 (MODY2), 12 (MODY3). Els pacients afectats amb MODY2 presenten mutacions en el gen de la glucoquinasa que condueixen a una reducció en l'activitat enzimàtica i en la secreció d'insulina i, com a conseqüència, a una lleugera hiperglucèmia.

La diabetis de tipus 2 està freqüentment associada a l'obesitat, ja que aproximadament un 45% dels homes i un 70% de les dones amb diabetis de tipus 2 són obesos. Molts estudis han trobat una associació entre l'increment de disponibilitat de lípids i la resistència a la insulina, suggerint que hi ha una relació causal entre els dos. La resistència a la insulina associada a l'excés de pes provoca un increment en la demanda de secreció d'insulina que contribueix a l'exhauriment de l'hormona en la cèl·lula β , donant lloc a una diabetis de tipus 2. Tot i que existeixen factors genètics que semblen contribuir tant a l'alteració de la sensibilitat a la insulina com a l'exhauriment de la cèl·lula beta, existeix la hipòtesi que un increment en els nivells de lípids podria ser un factor primari adquirit que, per activació d'un mecanisme de senyalització determinat, portés a una reducció en l'acció de la insulina.

Estudis recents suggereixen que les hormones circulants derivades del teixit adipós, com l'adiponectina, la leptina, la resistina i el factor de necrosi tumoral alfa, podrien tenir efectes importants sobre l'acció de la insulina en fetge i múscul (Hotamisligil, 1999; Mohamed-Ali, 1998; Shimomura, 1999; Steppan, 2001). La leptina és una proteïna de 16 kDa secretada pel teixit adipós. Des que va ser descoberta, l'estudi del seu paper fisiològic ha evolucionat des de ser considerada un senyal de sacietat fins a una hormona integrativa que respon i regula diferents vies endocrines amb efectes metabòlics directes sobre els teixits perifèrics. S'ha observat que en el cas de la diabetis de tipus 2 els pacients presenten nivells de leptina inferiors als mesurats en individus no diabètics (Dagogo-Jack, 2000). També s'ha observat que la leptina inhibeix l'autofosforilació del receptor de la insulina (Kennedy, 1997). Es creu que nivells baixos de leptina en la diabetis tipus 2, a més de contribuir a una major obesitat, podrien incrementar directament la resistència a la insulina i, per tant, empitjorar el procés (Ebihara, 2001). L'adiponectina i la resistina van ser descrites recentment com a productes de secreció del teixit adipós. L'adiponectina és secretada pels adipòcits i circula per la sang. Les concentracions plasmàtiques d'adiponectina disminueixen en animals i humans obesos, i en pacients amb diabetis tipus 2. L'adiponectina estimula l'oxidació d'àcids greixosos, disminueix els triglicèrids plasmàtics i millora el metabolisme de la glucosa mitjançant un increment en la sensibilitat a la insulina. A més, inhibeix el procés inflamatori i possiblement també l'aterogènesi (Beltowski, 2003).

Independentment de la causa, la resistència a la insulina desencadena un augment de la glucèmia, fet que pot comportar un efecte tòxic per la pròpia cèl.lula β . En general, els pacients de diabetis de tipus 2 reben com a tractament una dieta restringida, donat que sovint una disminució de l'obesitat condueix a una millora substancial en la malaltia. Alguns, a més, són tractats amb hipoglucemians orals; però els pacients que finalment progressen cap a un estat de deficiència d'insulina han d'acabar tractant-se amb l'hormona per sobreviure (Moller, 2001).

5. MODELS ANIMALS DE DIABETIS MELLITUS.

5.1. MODELS ANIMALS DE DIABETIS DE TIPUS 1.

Existeixen diversos models animals emprats per estudiar la patologia de la diabetis mellitus de tipus 1, així com per dissenyar i provar noves estratègies pel tractament de la malaltia. Actualment, els més utilitzats són els models animals de diabetis espontània i els de diabetis induïda experimentalment mitjançant la injecció de tòxics específics que actuen contra les cèl·lules β .

5.1.1. Models de diabetis espontània: ratolins NOD (non-obese diabetic).

La soca de ratolins NOD deriva d'una sublínia de ratolí Jcl:ICR, i va ser establerta als laboratoris Shionogi Aburahi, Japó, el 1980. El fenotip que presenten aquests animals és molt similar a l'observat en la diabetis autoimmune humana: polidípsia, poliúria, glucosúria severa, hiperglucèmia i manca d'insulina (Makino, 1980).

S'ha descrit la presència d'infiltració leucocitària en els illots del pàncrees d'aquests ratolins (un fet també característic en el desenvolupament de la malaltia en humans) a partir de les tres setmanes d'edat. Els principals autoantígens implicats en el procés autoimmune són GAD, (pro)insulina i IA-2 (Adorini, 2002).

L'edat d'aparició i el grau de la malaltia varia en funció del sexe. Les femelles desenvolupen la malaltia a les 10 setmanes d'edat, amb una incidència de la malaltia del 70-80% a les 30 setmanes; mentre que els mascles ho fan a les 20 setmanes, amb una incidència del 20% a les 30 setmanes. Els animals acostumen a morir entre 1 i 2 mesos després de l'aparició de la malaltia llevat que se'ls tracti amb una teràpia substitutòria d'insulina.

Existeixen teràpies efectives per a la prevenció i el tractament de la diabetis autoimmune en aquest model animal que, no obstant, han fallat quan s'han intentat aplicar en pacients humans. Això indica que no és fàcil extrapolar els resultats dels models animals, i es creu que podria ser degut a l'elevat grau de consanguinitat que presenten els ratolins NOD en comparació amb la gran heterogeneïtat de la població humana (Adorini, 2002). A més,

aquests animals són difícils de mantenir, ja que requereixen una estabulació lliure de patògens (SPF) molt controlada. Per tant, per dissenyar teràpies contra la hiperglucèmia normalment es fan servir altres models, com ara els ratolins tractats amb estreptozotocina.

5.1.2. Models de diabetis induïts experimentalment: tractament amb estreptozotocina (STZ).

La Streptozotocina (STZ) [2-deoxy-2(3-methyl-3-nitrosurea) 1-D-glucopyranosa] és un antibiòtic d'ampli espectre produït per *Streptomyces achromogenes*. El seu efecte diabetogènic va ser detectat pels Laboratoris Upjohn quan testaven antibiòtics potencials contra aquest microorganisme.

La STZ actua de manera selectiva sobre les cèl·lules β , a l'interior de les quals entra mitjançant el transportador GLUT2. S'ha proposat que, un cop dins la cèl·lula, la STZ pot realitzar el seu efecte tòxic per diferents mecanismes: 1) metilació del DNA, 2) generació de radicals lliures i 3) producció d'òxid nítric. La generació d'ions carboni (CH_3^+) a partir de la descomposició del radical nitrós de la molècula de STZ produeix el trencament del DNA per alquilació de bases. Aquesta fragmentació del DNA indueix la seva reparació per activació de l'enzim poli (ADP-ribosa) sintetasa. Això fa disminuir el contingut de NAD^+ intracel·lular i es produeix una disminució en la producció d'energia i el metabolisme proteic, provocant finalment la mort cel·lular. S'ha descrit que inhibidors de la poli(ADP-ribosa) sintetasa protegeixen la cèl·lula β de la depleció de NAD^+ i de la mort cel·lular induïda per STZ (Wilson, 1984).

L'estrès oxidatiu produït per la formació de radicals lliures té un efecte important en la toxicitat de la STZ. Actualment, però, existeix certa controvèrsia respecte el paper del NO com a mitjancer d'aquesta toxicitat. Estudis *in vitro* han mostrat que el NO té un efecte tòxic i que aquest pot ser produït per les pròpies cèl·lules (Turk, 1993; Kwon, 1994). No obstant, observacions més recents posen en dubte aquesta producció per part de la pròpia cèl·lula β que indueixi la seva mort (Papaccio, 2000).

El protocol d'administració de la STZ en ratolins també juga un paper important sobre el mecanisme d'inducció de la diabetis. L'administració intraperitoneal d'una única dosi de STZ a elevada concentració (>160 mg/kg de pes), provoca la destrucció ràpida de les

cèl·lules β per acció citotòxica directa, la qual cosa produeix una pèrdua de més del 90% de la insulina pancreàtica i, per tant, l'aparició d'hiperglucèmia. Alternativament es poden administrar múltiples dosis a baixa concentració de STZ (40-50 mg/kg pes). En aquest cas es redueix l'acció citotòxica de la STZ, però s'indueix una resposta inflamatòria contra les cèl·lules β , amb una infiltració limfocitària (insulitis) que les destrueix i causa una diabetis severa. Aquest mètode d'administració és l'anomenat "múltiple low dose streptozotocin" (MLDSTZ).

L'edat, el sexe i la soca del ratolí juguen un paper important en la susceptibilitat a desenvolupar insulitis i hiperglucèmia mitjançant el mètode de MLDSTZ. S'ha observat que, amb una dosi de 40 mg/kg de pes, les soques CD1 i C57Bl/KsJ presenten una major predisposició a desenvolupar insulitis i hiperglucèmia, mentre que les soques de ratolins BALB/c, C57Bl6/SJL, DBA/2J i C3H/He són resistents a aquesta dosi. Tanmateix, aquestes soques més resistents desenvolupen hiperglucèmia quan s'incrementa la dosi de STZ fins a 50 mg/kg de pes, sense presentar diferències significatives en el grau d'insulitis (Rossini, 1977).

5.2. MODELS DE DIABETIS DE TIPUS 2.

Les síndromes animals d'intolerància a la glucosa, entre les quals es trobaria la diabetis de tipus 2 moderada o severa, poden donar-se espontàniament o bé ser induïdes experimentalment en diverses espècies. En alguns casos es poden combinar ambdós elements, l'espontani i l'experimentalment produït. Tot i que no existeix un model que mimifiqui exactament la diabetis de tipus 2 humana, aquests animals poden ser emprats per investigar els mecanismes patogènics que porten al desenvolupament de les característiques típiques de la malaltia. També permeten dissenyar i provar noves aproximacions per a la prevenció i el tractament de la malaltia (Pickup and Williams).

La resistència a la insulina és un important factor etiològic en gairebé totes aquestes malalties. Normalment, es desenvolupa en un inici en múscul esquelètic i fetge, mentre que el teixit adipós es manté relativament sensible a la insulina (afavorint la deposició de triglicèrids sota la influència dels nivells elevats d'insulina) i es torna resistent posteriorment. D'altra banda, amb el temps, animals amb diabetis de tipus 2

desenvolupen complicacions micro i macrovasculars similars a les que apareixen en la diabetis humana.

5.2.1. Models espontanis.

Molts models de diabetis de tipus 2 espontanis són el resultat de mutacions monogèniques, com és el cas dels ratolins ob/ob, db/db, o les rates fa/fa. També poden ser degudes a defectes poligènics, com per exemple en el ratolí obès New Zealand (NZO) i en el hámster xinès (Bray, 1971; Pickup and Williams, 1997).

El gen *ob*, localitzat en ratolí al cromosoma 6, codifica per la leptina, una proteïna circulant que s'expressa únicament en teixit adipós blanc. La leptina actua sobre l'hipotàlem inhibint la gana, estimulant la despesa energètica i provocant una pèrdua de greix corporal. El ratolí ob/ob presenta una mutació en el gen *ob* que produeix una leptina anormal, de forma que provoca hiperfàgia, reducció de la despesa energètica i obesitat. Per altra banda, el ratolí db/db produeix leptina de forma normal, però els nivells circulants es troben molt incrementats. Això és degut a una mutació al gen del receptor de la leptina, la qual cosa altera la transducció de senyal de l'hormona. En el cas de la rata fa/fa també es dona una mutació diferent al gen del receptor de la leptina.

L'expressió fenotípica de les malalties espontànies es troba molt influenciada pel fons genètic (soca), l'edat i els factors ambientals, particularment la dieta. Moltes vegades la malaltia comença amb una fase d'hiperinsulinèmia i hiperplàsia de la cèl.lula β , amb hiperfàgia i obesitat, seguit per resistència a la insulina i intolerància a la glucosa (per exemple, en el cas de la rata Zucker fa/fa). Això pot progressar cap a una hiperglucèmia oberta i diabetis tipus 2 (cas del ratolí db/db). Posteriorment, s'altera la funcionalitat de la cèl.lula β , portant a una disminució en els nivells d'insulina, amb empitjorament de la hiperglucèmia, pèrdua de pes, cetosi ocasional i dependència de la insulina per la supervivència.

5.2.2. Models de diabetis de tipus 2 induïts experimentalment.

Les patologies similars a diabetis tipus 2 experimentals poden ser induïdes en animals mitjançant: a) destrucció química (per exemple, amb dosis baixes d'estreptozotocina) o eliminació quirúrgica d'una part de la massa de cèl.lula β ; b) lesió de l'hipotàlem ventromedial; c) alimentació amb dietes d'alt contingut en lípids o en sucre; 4) malnutrició *in utero*; 5) dosis elevades d'hormones contra-reguladores, especialment glucocorticoids; i 6) exposició perllongada a la hiperinsulinèmia. També, en el nostre laboratori, hem descrit diversos models de ratolins transgènics que presenten intolerància a la glucosa, resistència a la insulina i obesitat, com per exemple ratolins transgènics que expressen IGF-II en pàncrees (Devedjian, 2000), ratolins que sobreexpressen el gen de la PEPCCK a fetge (Valera, 1994) o a teixit adipós (Franckhauser, 2000) o animals transgènics que sobreexpressen la GK a fetge (Ferré, 2003).

5.2.2.1. Models induïts: dieta alta en lípids.

Està àmpliament acceptat que la diabetis tipus 2 és causada per una combinació de factors genètics i ambientals, principalment la dieta i el nivell d'activitat física, que poden promoure la progressió cap a una alteració de la tolerància a glucosa i una resistència a la insulina. Entre els factors ambientals, l'elevat contingut en greixos de les dietes occidentals típiques es considera la causa principal de la resistència a la insulina associada a obesitat. S'ha demostrat una resistència en la captació de glucosa induïda per insulina en molts individus amb alteració en la tolerància a la glucosa o diabetis de tipus 2.

Quan els rosegadors són alimentats amb una dieta d'elevat contingut en lípids desenvolupen ràpidament resistència a la insulina, hiperinsulinèmia, hiperglucèmia, i, en soques genèticament susceptibles, diabetis (Kraegen, 1986; Storlien, 1986; Surwit, 1988; Storlien, 1991). Els animals alimentats amb dieta alta en lípids representen un model animal d'interès, ja que es poden emprar com a eina per estudiar els mecanismes que resulten en una resistència a la insulina en individus obesos amb tolerància a la glucosa alterada o diabetis de tipus 2. Existeixen evidències experimentals segons les quals la senyalització de la insulina es troba alterada al múscul esquelètic d'humans obesos, resistents a la insulina. No obstant, encara no està clar si el defecte en la cascada de senyalització de la insulina és el mecanisme implicat en el desenvolupament de la resistència a la hormona o és una conseqüència d'aquesta resistència (Goodyear, 1995).

S'ha postulat que la resistència a la insulina induïda per alimentació amb greixos és mediada per una disminució de la translocació del transportador GLUT4 a la membrana cel·lular (Zierath, 1997). Per altra banda, l'activitat catalítica dels transportadors de glucosa és sensible als canvis en les propietats físiques i composicionals de la bicapa lipídica. Així, s'ha descrit que la resistència a la insulina associada a alimentació alta en greixos i obesitat és mediada, en part, per reduccions en l'activitat dels transportadors de glucosa relacionades amb la composició de la membrana (Stevenson, 1996). Hi ha evidències que demostren que una dieta alta en lípids pot alterar l'activitat intrínseca del transportador GLUT4 (Rosholt, 1994).

En animals alimentats amb dieta alta en lípids, la sobreexpressió de GLUT4 prevé el desenvolupament d'hiperglucèmia però no l'aparició d'obesitat (Ikemoto, 1995). No obstant, la sobreexpressió de GLUT4 únicament en teixit adipós blanc no prevé el desenvolupament d'hiperglucèmia o d'intolerància a la glucosa (Gnudi, 1995).

Tanmateix, s'ha descrit que en els pacients de diabetis de tipus 2 hi ha una alteració tant del transport com de la fosforilació de la glucosa pel múscul esquelètic en resposta a la insulina, però que, probablement, el pas limitant en l'acció de l'hormona és el defecte en la fosforilació del sucre (Bonadonna, 1996).

5.2.3. Models genètics induïts per genosupressió (ratolins *knock-out*).

Els models animals espontanis que s'han utilitzat normalment per estudiar la diabetis tipus 2, com els ratolins *ob/ob*, els *db/db* i les rates Zucker, no reproduïxen exactament la malaltia humana, sinó que són models on la diabetis succeeix secundàriament a l'obesitat massiva causada per mutacions en el gen de la leptina o el seu receptor. S'ha intentat obtenir nous models de diabetis tipus 2 mitjançant l'eliminació de l'expressió d'una proteïna de la cascada de senyalització de la insulina, com per exemple el receptor de la insulina o el substrat del receptor de la insulina 1 (IRS-1) (Araki, 1994; Tamemoto, 1994; Accili, 1996). En general, els models d'animals genosuprimits amb alteracions monogèniques en l'acció de la insulina han permès estudiar el paper potencial de les molècules de senyalització de la insulina en la resistència a l'hormona a nivell específic de teixit (Taula II).

En humans, les formes monogèniques de la diabetis, que inclouen mutacions en el gen de la insulina (Steiner, 1995), el receptor de la insulina (Taylor, 1995), o la MODY (Fajans, 2001), entre altres, constitueixen menys d'un 5% de tots els casos de la malaltia. La diabetis de tipus 2 és una malaltia poligènica i podria implicar polimorfismes en múltiples gens que codifiquen per proteïnes implicades en la senyalització i la secreció de la insulina, així com en el metabolisme intermediari (Stern, 2000). Així doncs, també s'han obtingut models genosuprimits combinats amb dobles deleccions heterozigotes en, per exemple, el receptor de la insulina i l'IRS-1 (Bruning, 1997a), IRS-1 i GK (Terauchi, 1997) i fins i tot la triple delecció heterozigota en el receptor de la insulina, IRS-1 i IRS-2 (Kido, 2000). En alguns d'aquests models combinats s'ha observat una evidència molt clara de l'epistàsia genètica respecte el desenvolupament de la malaltia. Així, la doble genosupressió $IR^{+/-}+IRS-1^{+/-}$ produeix resistència a la insulina, hiperinsulinèmia i hiperplàsia dels illots pancreàtics amb progressió cap a diabetes oberta en un 50% dels animals (Bruning, 1997a). Tanmateix, s'ha observat un efecte del fons genètic sobre aquest fenotip, donat que la mateixa doble genosupressió en tres soques diferents de ratolí produeix una gran variabilitat en la hiperinsulinèmia, la tolerància a la glucosa i la hiperplàsia dels illots que mostren aquests animals (Kulkarni, 2003). Per tant, els models poligènics han donat força a la idea que defectes menors en la secreció d'insulina i en la seva acció, quan es combinen, poden donar lloc a diabetis; emfatitzant la importància de les interaccions de diferents loci genètics en la producció de diabetis (Bruning, 1997a).

Els models genosuprimits amb alteracions específiques de teixit en el metabolisme dels lípids o de la glucosa han permès dissecar les contribucions individuals dels òrgans sensibles a insulina en l'homeòstasi de la glucosa. S'ha demostrat el paper central del greix com a teixit endocrí en el manteniment de la sensibilitat a la insulina i el desenvolupament de resistència a la insulina. Per altra banda, aquests models han mostrat també el paper potencial de l'alteració de l'acció de la insulina en les cèl·lules β pancreàtiques i cervell en el desenvolupament de deficiència d'insulina i obesitat (Mauvais-Jarvis, 2002).

Taula II. Fenotips de models animals amb deleccions de components de la via de

senyalització de la insulina	
Gen	Fenotip
Receptor d'insulina (IR)	Diabetis severa; mort post-natal als 3-7 dies (Accili, 1996; Bruning, 1997a)
IR (múscul)	Increment del teixit adipós, triglicèrids i àcids greixosos (Bruning, 1998 ; Kim, 2000)
IR (fetge)	Intolerància a la glucosa, hiperinsulinèmia, funció hepàtica alterada (Michael, 2000)
IR (cèl.lula β)	Secreció d'insulina alterada, alteració progressiva de la tolerància a la glucosa, alteracions en les cèl·lules β (Kulkarni, 1999)
IR (cervell)	Increment del teixit adipós i la leptina, resistència a la insulina, hipogonadisme hipotalàmic (Bruning, 2000)
Receptor d'IGF-1	Retard del creixement, homeòstasi de la glucosa normal (Accili, 1999)
IRS-1	Resistència a la insulina i l'IGF-1; hiperplàsia de la cèl.lula β ; síndrome metabòlica (Araki, 1994; Tamemoto, 1994)
IRS-2	Resistència a la insulina; reducció de la massa de cèl.lula β ; diabetis tipus 2 (Withers, 1998; Kido, 2000)
IRS-3	Sense fenotip aparent (Fantin, 2000)
IRS-4	Sense fenotip aparent (Fantin, 2000)
p85 α (hetero)	Sensibilitat a la insulina millorada, hipoglucèmia (Terauchi, 1999; Fruman, 2000)
Akt2	Resistència a la insulina i intolerància a la glucosa (Cho, 2001)
PTP1B	Sensibilitat a la insulina millorada; resistència a la obesitat induïda per dieta alta en lípids (Elchebly, 1999)
SHIP2 (hetero)	Sensibilitat a la insulina millorada (Clement, 2001)
IK κ β (hetero)	Sensibilitat a la insulina millorada (Yuan, 2001)
GLUT4	Hipertròfia cardíaca; homeòstasi de la glucosa normal (Katz, 1995)
GLUT4 (múscul)	Resistència a la insulina severa; intolerància a la glucosa (Zisman, 2000)
GLUT4 (adipós)	Intolerància a la glucosa; hiperinsulinèmia; resistència a la insulina (Abel, 2001)

5.2.3.1. Ratolins genosuprimits en IRS-1.

La tecnologia de genosupressió ha estat extensament utilitzada per investigar el paper fisiològic de les proteïnes de la família IRS. L'IRS-1 juga un paper important en la transducció de senyal de la insulina. El gen de l'IRS-1 és altament polimòrfic, amb variacions del 5% en la seqüència codificant d'individus normals i variacions d'entre el 10-20 % en els pacients amb diabetis de tipus 2 (Almind, 1993; Celi, 1995; Clausen, 1995; Mori, 1995). A més, s'han observat alteracions en el nivell d'expressió del receptor de la insulina i de l'IRS-1 tant en humans com en ratolins amb diabetis de tipus 2.

Per tal d'elucidar el paper fisiològic de l'IRS-1 *in vivo*, es van obtenir ratolins amb una disrupció del locus de l'IRS-1. Els ratolins homozigots per la genosupressió d'IRS-1 neixen vius, però pateixen retard en el creixement embrionari i post-natal (Araki, 1994 ; Tamemoto, 1994). Aquests animals són resistents als efectes hipoglucemians de la insulina i l'IGF-1 i mostren una tolerància a la glucosa lleugerament alterada, però no presenten diabetis, probablement degut a una hiperinsulinèmia compensatòria causada per una hiperplàsia selectiva de les cèl·lules β . No obstant, tot i que la massa de cèl·lula beta es troba incrementada en ratolins genosuprimits en IRS-1, els illots d'aquests animals presenten defectes en el contingut d'insulina i en la seva secreció en resposta a glucosa (Kulkarni, 1999). Aquests defectes estan causats per una alteració en l'alliberament, induït de forma autocrina, de Ca^{2+} de les reserves intracel·lulars, donant com a resultat una disminució en la concentració de Ca^{2+} lliure intracel·lular (Aspinwall, 2000).

Estudis de clamp hiperinsulinèmic-euglicèmic han clarificat les contribucions relatives dels teixits sensibles a insulina claus en la resistència a l'hormona *in vivo* (múscul esquelètic, fetge, teixit adipós). Tot i així, no està clar si la resistència a la insulina en els ratolins IRS-1^{-/-} es dona a nivell de fetge i/o teixits perifèrics, com múscul o teixit adipós; i tampoc està clar si estan afectades tant la via de ras/MAP kinasa com la via de la PI-3-quinasa.

Els ratolins IRS-1^{-/-} mostren un marcat defecte en el transport de glucosa estimulat per insulina i en la síntesi de glucogen muscular (Previs, 2000; Yamauchi, 1996). A nivell molecular, aquest defecte és causat per una reducció en l'activitat PI-3-quinasa estimulada per insulina associada amb proteïnes fosforilades en tirosines en múscul esquelètic. Aquesta alteració no és compensada per un increment en el contingut de proteïna IRS-2 i, després d'estimulació amb insulina, en la seva activació. Per contra, la

supressió de la producció hepàtica de glucosa mediada per insulina no és afectada degut a una compensació amb IRS-2, donant com a resultat una activitat PI-3-quinasa estimulada per insulina associada amb proteïnes fosforilades en tirosines equivalent a la dels ratolins control (Yamauchi, 1996; Previs, 2000).

També s'ha descrit que els ratolins IRS-1^{-/-} presenten característiques de la síndrome X, com la hipertrigliceridèmia, hipertensió i relaxació vascular endoteli-dependent disminuïda (Abe, 1998). Més recentment s'ha observat que els ratolins IRS-1^{-/-} mostraven osteopènia severa amb baixa renovació òssia, una característica de l'osteoporosi senil en humans vells (Ogata, 2000). Per tant, IRS-1 podria jugar un paper crític en el manteniment de la renovació dels ossos com a mediador de les accions anabòliques de la insulina i l'IGF-1. D'altra banda, els animals heterozigots per la deficiència en IRS-1 aparentment no exhibeixen un fenotip clínic (Araki, 1994).

Estudis amb ratolins genosuprimits en IRS-1 o cèl·lules derivades d'aquests animals han suggerit que l'IRS-2 podria compensar la deficiència d'IRS-1 de forma més efectiva en fetge i cèl·lula β que en múscul esquelètic, fibroblasts o adipòcits (Araki, 1994; Tamemoto, 1994; Bruning, 1997b; Kaburagi, 1997; Yamauchi, 1996). Estudis en ratolins amb genosupressió combinada en el receptor d'insulina, IRS-1 i IRS-2 suggereixen que IRS-1 juga un paper prominent en múscul esquelètic i IRS-2 ho fa al fetge (Kido, 2000). Es creu que IRS-1 i IRS-2 no són funcionalment intercanviables en teixits que són responsables de la producció de glucosa (fetge), captació de glucosa (múscul esquelètic i teixit adipós), i producció d'insulina (cèl·lules β pancreàtiques).

Aquests animals podrien servir com a model de l'estat de resistència a insulina degut a un defecte molecular conegut, ja que el fenotip dels ratolins genosuprimits en IRS-1 (resistència a la insulina a nivell post-receptor) s'assembla als fenotips de la diabetis tipus 2 en estadis inicials pre-diabètics.

6. TERÀPIA GÈNICA PER A LA DIABETIS.

La teràpia gènica consisteix en la modificació del genoma cel·lular mitjançant la introducció de material genètic forà (DNA o RNA) per tal de corregir o millorar els símptomes d'una malaltia (Mulligan, 1993; Crystal, 1995).

La teràpia gènica pot dividir-se en:

a) *Teràpia gènica in vivo*. La transferència gènica *in vivo* requereix sistemes per tal de fer arribar el vector al tipus cel·lular específic. Això es pot fer utilitzant un vector viral o no viral. En les cèl·lules diana en divisió es necessita la integració estable del gen, i això s'ha de donar sense provocar la disrupció de gens endògens. A més, el gen terapèutic s'ha d'expressar amb els nivells suficients durant un període llarg de temps. D'altra banda, el producte gènica, així com les proteïnes derivades del vector viral, no han de desencadenar una resposta immunitària que provocaria una disminució de l'expressió del gen introduït.

b) *Teràpia gènica ex vivo*. Consisteix en la modificació de cèl·lules obtingudes del pacient, que són subseqüentment implantades de nou en el malalt. Degut a l'avanç en els mètodes d'encapsulació cel·lular, també es considera adequat com a aproximació de teràpia gènica l'ús de cèl·lules exògenes que expressen el gen normal, ja sigui de forma natural o després de sotmetre-les a manipulació genètica. La transferència gènica *in vitro* té l'avantatge que només un petit nombre de cèl·lules del pacient són exposades a la manipulació genètica. D'altra banda, aquest sistema permet un estudi acurat de la funció cel·lular i estabilitat genètica després de la reimplantació en el pacient.

Un cop transferit el material genètic, el producte del nou gen pot actuar sobre la pròpia cèl·lula modificada, sobre les cèl·lules veïnes, o bé, entrar en circulació sanguínia per actuar sobre cèl·lules distants (Blau, 1995). El material genètic pot ser introduït per addicionar nous gens o per augmentar la dosi gènica (Dellorusso, 2002), per a reemplaçar gens alterats, o bé per a silenciar l'expressió de certs gens (Aoki, 2003).

Calen uns determinats requisits per tal que la teràpia gènica sigui factible. En primer lloc, cal tenir clonat el gen a introduir i disposar del vector adequat per a la seva administració. Posteriorment, és necessari que aquest gen d'interès entri dins la cèl·lula diana, arribi al nucli i s'hi expressi correctament. Un cop aconseguit això, cal que hi hagi efectes curatius (eficiència) i que no provoqui efectes secundaris (seguretat).

Pel que fa als mètodes per introduir DNA dins les cèl·lules diana, podem distingir dos grans grups: 1) els vectors virals, basats en l'ús de retrovirus, adenovirus, virus adenoassociats i virus herpes; i 2) els vectors no virals, que poden ser físics/químics (injecció directa de DNA, electroporació, liposomes) o mètodes biològics (cromosomes artificials, recombinacions específiques...) (Niidome, 2002; Herweijer, 2003).

Respecte als vectors virals, en un principi, els més emprats van ser els retrovirus, però actualment estan essent desplaçats pels virus adenoassociats (AAV), pels lentivirus i pels adenovirus (Verma, 1997). Els adenovirus tenen la capacitat d'infectar cèl·lules que no es divideixen i, a més, permeten expressar nivells elevats de gens exògens *in vivo*. No obstant, l'expressió és transitòria, degut a que aquests vectors no s'integren al genoma i, a més, són molt immunogènics. Les últimes generacions d'aquests vectors són els denominats "gut-less", en els quals s'han deleccionat els gens virals, deixant únicament els elements que marquen l'inici i el final del genoma i les seqüències d'empaquetament del virus (Verma, 1997). Els AAV s'integren en el genoma, permeten expressar gens durant llargs períodes de temps (més de sis mesos) i no sembla que provoquin resposta immune (Verma, 1997). S'han descrit un gran nombre d'estudis en els quals s'utilitzen aquests vectors per transferir gens a múscul esquelètic (Kessler, 1996; Fisher, 1997). Els lentivirus també s'integren en el genoma i poden ser molt útils per expressar gens a llarg termini (Verma, 1997; Trono, 2000).

Els vectors no virals presenten com a principal avantatge la seva seguretat. No obstant, tenen l'inconvenient de no ser tan eficients com els vectors virals a l'hora de transferir gens *in vivo*. Tot i això, la seva fàcil manipulació, el baix cost de la seva producció i l'elevada flexibilitat en la mida del transgèn introduït, han fet dels vectors no-virals un dels sistemes de transferència gènica més atractius per a la seva utilització en teràpia gènica (Niidome, 2002; Herweijer, 2003).

Entre les diferents aproximacions existents, la injecció directa de DNA plasmídic en solució és la més senzilla i segura. S'ha descrit que les cèl·lules musculars poden captar i expressar un determinat gen quan el seu DNA codificant és injectat al teixit (Wolf, 1990). La limitació més important d'aquesta aproximació és la baixa eficiència en la transferència i la baixa expressió del transgèn, ja que aquesta queda localitzada a la zona de la injecció del DNA. Per aquest motiu s'han desenvolupat diversos sistemes físics i químics que han

permès augmentar l'eficiència de transferència del DNA a la cèl.lula diana, com són la utilització d'ultrasons, la injecció hidrodinàmica, el *gene-gun*, l'electrotransferència de DNA en solució, els lípids o polímers catiónics...(Niidome, 2002; Herweijer, 2003).

La tècnica d'electroporació es basa en l'ús de polsos curts d'alt voltatge per trencar la barrera de la membrana cel·lular. Es realitza mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric extern, que sobrepassa la capacítancia de la membrana cel·lular, per tal d'induir un trencament transitori i reversible de la membrana. Aquest estat transitori de permeabilitat es pot utilitzar per introduir a les cèl·lules una varietat de molècules diferents, tant per difusió simple en el cas de molècules petites, com per processos dirigits electroforèticament (per exemple en el cas de la transferència de DNA) (Neumann, 1999).

L'electroporació ha demostrat ser útil tant *in vitro* com *in vivo* (Gehl, 2003). Tot i que els procediments d'electroporació inicials causaven un dany cel·lular considerable, el desenvolupament durant les passades dècades ha portat a una sofisticació dels equipaments emprats i a una optimització dels protocols a seguir. El dany tissular està associat directament al grau de permeabilitat cel·lular produït, el qual, al seu torn, ve determinat per les característiques del camp elèctric administrat. Per aquest motiu, s'estan estudiant diverses aproximacions, entre les quals es troba el pretractament amb enzims com la hialuronidasa (McMahon, 2001), que permet reduir la intensitat del camp elèctric, així com facilitar la recuperació tissular.

Aquesta tecnologia ha estat utilitzada per diferents usos: producció de proteïnes que manquen en diverses síndromes amb deficiència, producció de citoquines pel tractament de tumors, producció d'antígens en cèl·lules tumorals per potenciar una resposta immunitària de l'hoste, vacunes de DNA, transfecció amb RNA, etc.

6.1. APROXIMACIONS DE TERÀPIA GÈNICA PER A DIABETIS.

Els tractaments que s'utilitzen actualment per la diabetis mellitus de tipus 1 i per la de tipus 2 són imperfectes, ja que no permeten un control total de la glucèmia i, per tant, no eviten l'aparició de les complicacions secundàries associades a la malaltia. Per tant, cal desenvolupar noves aproximacions terapèutiques per tal de millorar o substituir els

tractaments actuals. Amb aquest motiu, s'estan estudiant diferents estratègies de teràpia gènica, tant per a la diabetis de tipus 1 com per a la de tipus 2.

El tractament actual de la diabetis de tipus 1 es basa en la correcció de la manca d'insulina mitjançant l'administració subcutània de l'hormona, o bé, amb el trasplantament de pàncrees o illots. No obstant, la teràpia substitutòria d'insulina no ofereix uns perfils fisiològics de secreció de l'hormona normals, no prevé el desenvolupament de complicacions secundàries a llarg termini, i existeix un elevat risc d'aparició d'episodis d'hipoglucèmia. Per altra banda, el trasplantament de pàncrees o illots té com a limitació la manca de donants d'òrgans, així com el requeriment d'un règim d'immunosupressió crònica.

Les aproximacions per a la teràpia gènica de la diabetis de tipus 1 es poden dividir en tres grans blocs. En primer lloc, el desenvolupament de mecanismes de prevenció de la destrucció autoimmune de les cèl·lules β , amb la qual cosa es podrien salvar tant els illots trasplantats com els illots propis dels individus pre-diabètics. En pacients amb diabetis oberta, la inducció de la regeneració dels illots de Langerhans podria reemplaçar els illots destruïts, amb la condició que l'autoimmunitat sigui bloquejada (Efrat, 1998). En segon lloc, es podrien trasplantar en pacients diabètics tipus 1, cèl·lules productores d'insulina derivades de cèl·lules β , derivades d'altres tipus cel·lulars (com cèl·lules hepàtiques o musculars)(Muzzin, 1997; Gros, 1999; Riu, 2002) o obtingudes per diferenciació de cèl·lules mare embrionàries o adultes cap a cèl·lules β (Soria, 2000; Ramiya, 2000). Per últim, una aproximació diferent per a la teràpia gènica de la diabetis podria consistir en la reducció de la hiperglucèmia diabètica mitjançant un increment en la captació i utilització de la glucosa pel fetge i/o els teixits perifèrics.

D'altra banda, molts pacients amb diabetis tipus 2 poden ser controlats amb dieta i medicació oral. Tot i això, hi ha una disminució gradual en la funció de la cèl·lula β , associada a un increment en els nivells de glucosa sanguínia al llarg del temps (Matthews, 1998). Molts dels pacients acaben necessitant injeccions d'insulina per tal d'aconseguir un millor control de la glucèmia. Els pacients amb diabetis tipus 2 incontrolada desenvolupen complicacions vasculars similars a les dels pacients de diabetis tipus 1; per tant, un control adequat de la glucosa sanguínia permet una millora en la progressió de la malaltia en pacients amb diabetis tipus 2. Donat que en els malalts de diabetis de tipus 2 no hi ha

el problema de l'autoimmunitat, un increment parcial en la secreció d'insulina podria ser suficient en aquests pacients per tal de reduir marcadament els nivells sanguinis de glucosa. A més del defecte en la cèl.lula β , la resistència a la insulina i l'increment de la producció hepàtica de glucosa contribueixen substancialment al desenvolupament de la hiperglucèmia en la diabetis de tipus 2. Teòricament, una reducció de la resistència a la insulina podria disminuir el requeriment de l'hormona i inhibir la progressió de l'exhauriment de la cèl.lula β . Així doncs, la potenciació de la sensibilitat a la insulina i la supressió de l'alliberament de glucosa hepàtica podrien ser dianes addicionals de la teràpia gènica per la diabetis tipus 2. Això podria corregir algunes altres alteracions metabòliques associades a la diabetis tipus 2, com la hiperlipidèmia.

Per tant, l'objectiu de la teràpia gènica de la diabetis tipus 2 seria incrementar la captació perifèrica de glucosa, principalment en múscul i teixit adipós, i disminuir la producció hepàtica de glucosa.

6.2. APROXIMACIONS DE TERÀPIA GÈNICA CENTRADES EN INCREMENTAR LA CAPTACIÓ DE GLUCOSA.

Moltes de les complicacions vasculars i altres processos patològics que es donen en la diabetis són mediades per l'excés de glucosa. El control de la glucèmia pot retardar o prevenir moltes d'aquestes complicacions característiques tant de la diabetis de tipus 1 com de la diabetis de tipus 2.

La hiperglucèmia diabètica és el resultat d'una disminució en la captació del sucre pel fetge i teixits perifèrics, sobretot múscul esquelètic, així com d'un increment en la producció hepàtica de glucosa (De Fronzo, 1997). Tant la hiperglucèmia de la diabetis tipus 1 com la de la diabetis tipus 2 podria ser disminuïda mitjançant l'increment de la captació de glucosa pel fetge i teixits perifèrics.

6.2.1. Paper del múscul esquelètic en l'homeòstasi de la glucosa.

El múscul esquelètic és el teixit perifèric més important involucrat en la captació de glucosa després d'una ingesta oral del sucre. Constitueix al voltant del 40% de la massa corporal i s'ha estimat que elimina aproximadament el 75% de la glucosa de la circulació

sanguínia després d'una ingesta d'aliments (DeFronzo, 1997). La captació de glucosa pel múscul depèn de diferents etapes reguladores, com el pas de glucosa de la sang a l'espai intersticial, el transport transmembrana cap a l'interior de la cèl.lula muscular i el metabolisme intracel.lular del sucre. Cadascuna d'aquestes etapes pot ser limitant sota circumstàncies específiques (Richter, 2001).

El múscul capta glucosa per difusió facilitada de manera tant dependent com independent d'insulina. Aquest teixit expressa nivells relativament elevats de transportador de GLUT4, responsable del transport de glucosa dependent d'insulina, i nivells baixos de transportador GLUT1, que està localitzat a la membrana plasmàtica i és el responsable del transport basal de glucosa, independent d'insulina (Kahn, 1996; Olson, 1996).

La reacció inicial en la utilització de la glucosa per part del múscul és la fosforilació del sucre per la HKI i HKII. L'expressió de la HKI és ubíqua i constitutiva, mentre que l'expressió de HKII és específica de múscul i teixit adipós, i és induïda per la insulina (Iynedjian, 1993; Printz, 1993). Tot i això, tots dos enzims presenten una baixa Km per la glucosa i s'inhibeixen per glucosa-6-fosfat. GLUT1, juntament amb HKI, es consideren responsables de la captació basal de glucosa. D'altra banda, s'ha suggerit que l'acció de la insulina sobre el GLUT4 i HKII és clau en el control de la captació de glucosa pel múscul. En condicions basals, el transportador GLUT4 es localitza en vesícules intracel.lulars i es transloca a la membrana plasmàtica en resposta a insulina. Aquesta translocació sembla ser el primer mecanisme pel qual la insulina estimula la captació de glucosa (Rea i James, 1997). La insulina també induïx la transcripció del gen de la HKII (Printz, 1993; Postic, 1994; Manchester, 1996), i, per tant, els nivells de mRNA i l'activitat de la HKII estan disminuïts quan la insulina circulant és baixa o quan la senyalització de la insulina està alterada. Per tant, degut a la manca d'insulina en diabetis tipus 1 i a la resistència a la hormona en diabetis tipus 2, el múscul esquelètic és incapaç de captar glucosa de la sang.

Gran part de la glucosa que entra a les fibres musculars en resposta a la insulina és convertida en glucogen. La síntesi de glucogen està alterada en diabetis de tipus 2 i en individus resistents a la insulina amb una tolerància a la glucosa normal predisposats a desenvolupar diabetis de tipus 2 (DeFronzo, 1997). La glucogen sintasa (GS) és un enzim clau en el control de la formació de glucogen regulat per insulina. S'ha demostrat en

animals transgènics que sobreexpressen GS en múscul esquelètic que el transport de glucosa no és estrictament el pas limitant per a la síntesi de glucogen (Mandarino, 1995). Els resultats obtinguts en aquests animals recolzen la hipòtesi que l'activació de la GS, així com el transport de glucosa, contribueixen a l'acumulació de glucogen en resposta a insulina en el múscul esquelètic. De tota manera, estudis en animals transgènics que sobreexpressen HKII semblen indicar, si més no en condicions d'hiperinsulinèmia i d'hiperglucèmia, que la fosforilació de la glucosa és el pas limitant en la captació del monosacàrid per part del múscul (Chang, 1996).

6.2.2. Increment de la captació i utilització de glucosa pel múscul esquelètic.

Si bé un increment en el contingut en transportadors de glucosa en múscul esquelètic de ratolins transgènics que sobreexpressen GLUT1 (Marshall, 1993; Ren, 1993), o GLUT4 (Ikemoto, 1995; Liu, 1993; Ren, 1994; Treadway, 1994), resulta en un increment en la utilització de glucosa i emmagatzematge de glucogen, i en una disminució en els nivells d'insulina, diversos estudis han suggerit que la fosforilació de la glucosa és el pas regulador en la utilització del sucre. Així, el transport de glucosa pel múscul en resposta a situacions d'euglicèmia/hiperinsulinèmia està marcadament alterat en pacients de diabetis tipus 2 (De Fronzo, 1997). Tot i això, la fosforilació de la glucosa intracel·lular sembla estar alterada més fortament i, com a resultat, incrementa la concentració de glucosa lliure. Això indica que encara que ambdós, el transport de glucosa i la seva fosforilació, són resistents a l'acció de la insulina, l'alteració de la fosforilació de la glucosa és probablement el pas limitant en l'acció de la hormona (De Fronzo, 1997). A més, el tractament amb insulina de múscul cardíac de rata (Cheung, 1978) i de miocits de rata aïllats (Manchester, 1994) porta a l'acumulació intracel·lular de glucosa lliure, la qual cosa indica que la fosforilació de la glucosa està saturada. També s'ha observat acumulació de glucosa lliure intracel·lular en múscul esquelètic d'animals transgènics que sobreexpressen GLUT1, la qual cosa indica que la fosforilació de la glucosa està saturada quan incrementa el flux de glucosa cap a l'interior del teixit (Gulve, 1994). D'altra banda la sobreexpressió de la HKII específicament en múscul esquelètic de ratolins transgènics provoca un increment modest en la capacitat de captar glucosa pel múscul esquelètic aïllat (Chang, 1996). No obstant, no s'observa un efecte net en la tolerància a la glucosa o a l'acció de la insulina en aquests ratolins transgènics. A més, la sobreexpressió

d'ambdós, GLUT4 i HKII, en ratolins doble transgènics (Lombardi, 1997) no incrementa *in vivo* la utilització de la glucosa basal ni estimulada, ni tampoc millora la tolerància a la glucosa o l'acció de la insulina, en comparació amb transgènics que sobreexpressen únicament GLUT4 (Ikemoto, 1995; Liu, 1993; Ren, 1994; Treadway, 1994). Part de la limitació en la utilització de la glucosa imposada per la HKII pot ser el resultat de la inhibició *feed-back* de l'enzim pel seu producte, la glucosa-6-fosfat (lynedjian, 1993; Printz, 1993).

L'expressió de la HKII és induïda per insulina. Aquest enzim té una baixa Km per glucosa i és inhibit per la glucosa-6-fosfat. Per contra, l'enzim glucoquinasa (GK) té una elevada Km per la glucosa i la seva activitat no és inhibida per glucosa-6-P a concentracions fisiològiques. L'expressió de GK en múscul esquelètic de ratolins transgènics o en rates transfectades amb adenovirus que expressen GK, incrementa la captació de glucosa (Jiménez-Chillarón, 1999; Otaegui, 2000) i redueix la hiperglucèmia diabètica (Otaegui, 2000). Tanmateix, el descens en els nivells de transportadors de glucosa al múscul esquelètic durant la diabetis podria ser responsable de la manca d'una normalització completa de la hiperglucèmia en aquests ratolins. A més, la injecció d'insulina a ratolins transgènics que expressen GK tractats amb STZ porta a normoglucèmia, mentre que els ratolins control tractats amb STZ es mantenen altament hiperglucèmics. (Otaegui, 2000).

Tots aquests resultats suggereixen que la manipulació de les cèl·lules musculars de forma que expressin l'enzim GK permet incrementar la captació i utilització de glucosa per part d'aquest teixit. Aquesta podria resultar una bona aproximació per tal de contrarestar la hiperglucèmia diabètica.

III. OBJECTIUS

Per tal de millorar la teràpia de la diabetis mellitus s'estan investigant diferents aproximacions, entre les quals es troba la disminució de la hiperglucèmia característica tant de la diabetis tipus 1 com tipus 2. En aquest treball ens vam proposar investigar la capacitat del múscul esquelètic per contrarrestar la hiperglucèmia mitjançant un increment en la seva captació i utilització de glucosa. En el nostre laboratori s'havien generat animals transgènics que expressaven el gen de la GK en múscul esquelètic, i aquests animals presentaven una disminució de la hiperglucèmia diabètica i una major sensibilitat als efectes hipoglucèmians de la insulina. En el present treball ens vàrem plantejar aprofundir en l'estudi de l'efecte de l'expressió de GK en múscul esquelètic en models de diabetis tipus 1 o en models de resistència a la insulina. També es va investigar si es podia millorar aquest efecte mitjançant un increment dels transportadors en múscul esquelètic. Per tant, els objectius concrets han estat:

1. ESTUDIAR L'EFECTE DE L'EXPRESSIÓ DE GK EN MÚSCUL ESQUELÈTIC SOBRE LA DIABETIS DE TIPUS 1. Aquest objectiu es va centrar en:

1.1. Obtenir ratolins dobles transgènics que expressessin GLUT2 i GK en múscul esquelètic i estudiar la seva capacitat de contrarestar la hiperglucèmia diabètica:

1.1.1. *Obtenció i caracterització de ratolins transgènics que expressin GLUT2 en múscul esquelètic.*

1.1.2. *Obtenció de ratolins dobles transgènics que expressin GLUT2 i GK en múscul. En aquests animals es va estudiar l'efecte de l'expressió de GLUT2 i GK en múscul sobre la hiperglucèmia diabètica induïda per tractament amb STZ.*

1.2. Desenvolupar una aproximació de teràpia gènica *ex vivo* centrada en expressar la GK en cèl.lules musculars en cultiu i el seu posterior transplantament. Estudiar els seus efectes sobre la hiperglucèmia en ratolins diabètics.

2. ESTUDIAR L'EFECTE DE L'EXPRESSIÓ DE GK EN MÚSCUL ESQUELÈTIC SOBRE LA DIABETIS DE TIPUS 2. Aquest objectiu es va centrar en:

2.1. Obtenir ratolins IRS-1^{-/-} que expressessin GK en múscul esquelètic i estudiar la contrarestar dels efectes diabetogènics d'una dieta alta en lípids en aquests animals.

2.2. Electroransferir el gen de la GK *in vivo* a múscul esquelètic de ratolins IRS-1^{-/-} i estudiar el seu efecte sobre la sensibilitat a la insulina.

IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ

PART I:

**EXPRESSIÓ DE LA GLUCOQUINASA AL
MÚSCUL ESQUELÈTIC:
CONTRARESTACIÓ DE LA DIABETIS DE
TIPUS 1**

La hiperglucèmia diabètica és el resultat d'una disminució en la captació del sucre pel fetge i pels teixits perifèrics, sobretot múscul esquelètic, així com d'un increment en la producció hepàtica de glucosa (De Fronzo, 1997). Per tant, la hiperglucèmia podria ser disminuïda mitjançant l'increment de la captació de glucosa pel fetge i teixits perifèrics.

El múscul esquelètic és el teixit perifèric més important implicat en la captació de glucosa després d'una ingesta. Per això, en el nostre laboratori ens vam plantejar manipular el múscul esquelètic per tal d'incrementar la captació i utilització de la glucosa mitjançant un augment en el transport i/o la fosforilació del sucre en aquest teixit. Així, havíem obtingut prèviament ratolins transgènics que expressaven l'enzim hepàtic GK en múscul esquelètic. Aquests animals presenten un increment en la captació de glucosa i una reducció de la hiperglucèmia diabètica (Otaegui et al., 2000). Tanmateix, el descens en els nivells de transportadors de glucosa al múscul esquelètic durant la diabetis podria ser responsable de la manca d'una normalització completa de la hiperglucèmia en aquests ratolins. No obstant, ratolins tractats amb STZ que expressaven GK en múscul esquelètic presentaven una sensibilitat als efectes de la insulina molt millorada respecte dels animals controls diabètics (Otaegui et al., 2000).

S'ha descrit una correlació entre l'afinitat per la glucosa de les isoformes de transportadors de glucosa i l'afinitat per glucosa de les hexoquinases amb les quals aquests transportadors són expressats. El GLUT2 normalment s'expressa en teixits que expressen glucoquinasa, principalment en hepatocits i cèl.lules beta pancreàtiques. El GLUT2 juga un paper important en la captació de glucosa pels hepatocits així com en la secreció d'insulina de les cèl.lules beta, i es considera el sensor de la glucosa en un ampli marge de concentracions. Contràriament als transportadors de múscul esquelètic GLUT4 i GLUT1, el transportador GLUT2 té una elevada Km per a la glucosa i la seva translocació a la membrana plasmàtica no és regulada per insulina. Així, elevacions en els nivells de glucosa sanguínia durant el període postprandial incrementen linealment la velocitat de transport de glucosa i la concentració intracel.lular del sucre. Donat que ambdós, GLUT2 i GK, tenen una elevada Km per la glucosa, això assegura que la captació de glucosa al fetge i a les cèl.lules beta sigui proporcional a la concentració de glucosa extracel.lular quan aquesta és elevada. Així, l'expressió de GLUT2 en múscul esquelètic de ratolins transgènics que expressen GK podria resultar en un increment en el transport de glucosa en aquest teixit.

Per això, en el nostre estudi ens vam proposar, en primer lloc, aprofundir en l'estudi de l'efecte de l'expressió de GK en múscul esquelètic en un model experimental de diabetis tipus 1. Per tal d'augmentar el transport de glucosa, que podria ser un factor limitant en la captació del sucre pel múscul en els ratolins transgènics que expressen GK diabètics, es van generar ratolins transgènics que expressaven GLUT2 en múscul esquelètic, i ratolins dobles transgènics que expressaven ambdós, GLUT2 i GK. Amb aquesta estratègia es pretenia incrementar la captació de glucosa muscular i, donat el cas, determinar si aquests animals contrarestarien la hiperglucèmia diabètica.

En segon lloc es va estudiar si cèl.lules musculars genèticament manipulades per tal d'expressar GK podrien eliminar l'excés de glucosa de la sang, sense causar hipoglucèmia. Aquesta podria ser una nova aproximació de teràpia gènica *ex vivo* per tal de disminuir la hiperglucèmia diabètica. Amb aquesta finalitat, mioblasts de ratolí C₂C₁₂ van ser transfectats de forma estable amb un gen quimèric que permetia l'expressió de l'enzim GK. Després de la caracterització i l'estudi d'aquestes cèl.lules, es va procedir al seu transplantament en ratolins C3H singènics als quals es va induir diabetis experimental per tractament amb STZ. Així, es va estudiar la capacitat d'aquestes cèl.lules musculars que expressen GK de contrarestar o prevenir la hiperglucèmia diabètica.

1. ESTUDI EN RATOLINS DOBLES TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN GLUT2 I GK EN MÚSCUL ESQUELÈTIC DE LA CAPACITAT DE CONTRARESTAR LA HIPERGLUCÈMIA DIABÈTICA.

En aquesta primera part de l'estudi es va investigar si un increment en el nombre de transportadors de glucosa al múscul esquelètic de ratolins transgènics MLC/GK permetria millorar els resultats prèviament obtinguts amb aquests animals. Per tant, el primer pas va consistir en l'obtenció i caracterització de ratolins transgènics que expressaven el transportador GLUT2 en múscul esquelètic. Posteriorment, aquests animals van ser encreuats amb ratolins transgènics MLC/GK per tal d'obtenir els dobles transgènics MLC/GLUT2-MLC/GK (GLUT2+GK). Aquests ratolins, que expressaven GLUT2 i GK en múscul esquelètic, van ser tractats amb STZ i es va estudiar si l'increment en el transport i la fosforilació de glucosa al múscul permetia aconseguir una normalització de la hiperglucèmia diabètica.

1.1. OBTENCIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN GLUT2 EN MÚSCUL ESQUELÈTIC.

Així doncs, en primer lloc, es va procedir a l'obtenció de ratolins transgènics que expressaven el transportador GLUT2 en múscul esquelètic sota el control del promotor del gen de la cadena lleugera de la miosina (MLC). El gen de la cadena lleugera de la miosina és específic de múscul esquelètic, i presenta dos promotors constitutius diferents i *splicing* alternatiu que genera dos mRNA que codifiquen per MLC1f i MLC3f (Rao et al., 1996). S'ha descrit que un gen quimèric que contingui 1.2 Kb del promotor MLC1f més un fragment de 0.9 Kb de l' *enhancer* d'aquest promotor reproduceix moltes de les característiques d'expressió del gen endogen. Així, s'ha observat que l'expressió d'un transgen sota el control d'aquest promotor resulta en un gradient rostrocaudal i un elevat nivell d'expressió del gen exogen en animals transgènics (Rao et al., 1996; Marshall et al., 1993; Liu et al., 1993; Otaegui et al., 2000). Per tant, la utilització d'aquest promotor permetria dirigir l'expressió del gen del GLUT2 de forma constitutiva al múscul esquelètic de ratolins transgènics.

1.1.1. Construcció del gen quimèric MLC/GLUT2.

El gen quimèric que s'utilitza en aquesta part de l'estudi es va obtenir mitjançant la fusió del promotor del gen de la cadena lleugera de la miosina (MLC) de rata al cDNA del transportador de glucosa GLUT2 humà. El fragment del cDNA del GLUT2 contenia la seqüència codificant completa i el senyal de poliadenilació. Cada una de les parts que formaven el constructe es trobava en un plasmidi diferent i, per tant, varen ser necessàries diverses passes de subclonació fins a obtenir el gen quimèric desitjat.

Per tal de generar el gen quimèric MLC/GLUT2 es va digerir el plasmidi pGEM/GLUT2, que contenia el cDNA del GLUT2 humà, amb l'enzim de restricció *HincII* (Figura 1). Aquest fragment *HincII*-*HincII*, que contenia tant el *cap site* com 105 pb de seqüència no codificant unida a l'extrem 5' del cDNA del GLUT2, es va subclonar a la diana de restricció *SmaI* del plasmidi pMDAF2, que contenia un fragment de 1.5 Kb del promotor MLC1. Per tal d'augmentar l'estabilitat del RNA missatger del transgen, aquest subclonatge introduïa a l'extrem 3' del cDNA del GLUT2 un fragment de 0.8 Kb que contenia un petit intró i el senyal de poliadenilació de l'antigen T SV40. A més, per tal d'assegurar uns elevats nivells d'expressió en el múscul esquelètic, aquest constructe també portava un fragment *SphI*-*HindIII* genòmic de 0.9 Kb del gen MLC1/3 que contenia una seqüència "*enhancer*" o activadora específica de múscul. El plasmidi final va ser designat pMLC1/GLUT2 (Figura 1).

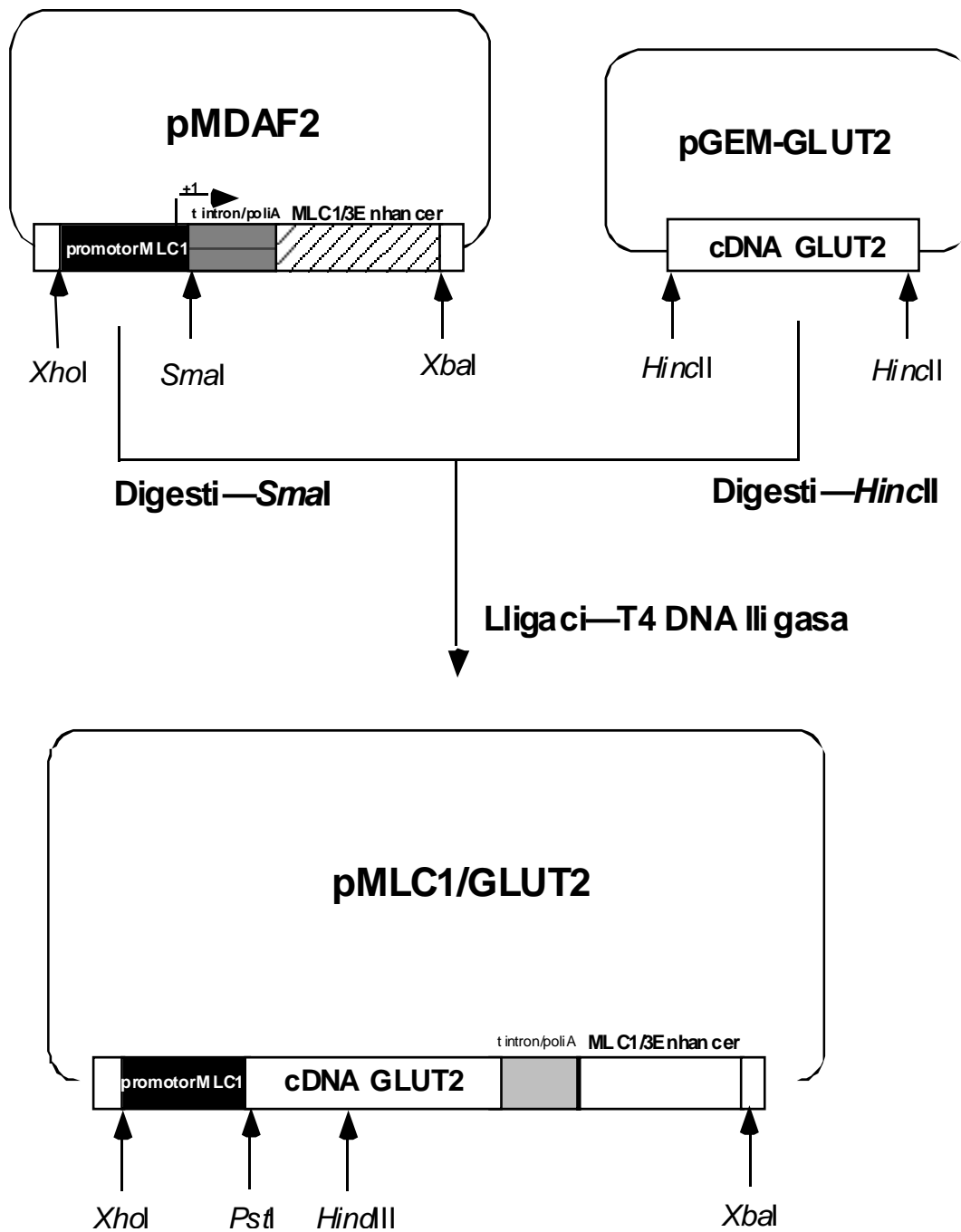


Figura 1. Construcció del gen quimèric MLC/GLUT2. Es va fusionar el fragment *HindIII-HindIII* del cDNA del GLUT2 al fragment de 1.5 Kb del promotor del MLC1.

1.1.2. Generació de ratolins transgènics.

El gen quimèric MLC/GLUT2 (Figura 2) es va separar del plasmidi mitjançant digestió amb els enzims de restricció *Xho*I-*Xba*I, es va purificar per electroelució i va ser microinjectat en oòcits fecundats de ratolí que es van transferir posteriorment a femelles receptores.

A les tres setmanes del naixement, es van analitzar els animals per detectar la presència del transgen mitjançant anàlisi per Southern blot. Es van obtenir vuit animals fundadors que havien integrat el transgen en el seu genoma. Aquest estudi va ser realitzat amb dues de les vuit línies de transgènics establertes, les que presentaven un major nombre de còpies del transgen. Una de les dues línies, MLC/GLUT2-39 (Tg1) havia integrat unes 20-25 còpies del transgen i l'altra línia, MLC/GLUT2-76 (Tg2) havia incorporat unes 15-20 còpies del constructe en el seu genoma. Al llarg d'aquest estudi es van utilitzar ratolins mascles de la generació F1 i F2 d'aqueste línies. Es van utilitzar com a control ratolins germans de l'origen dels animals transgènics.

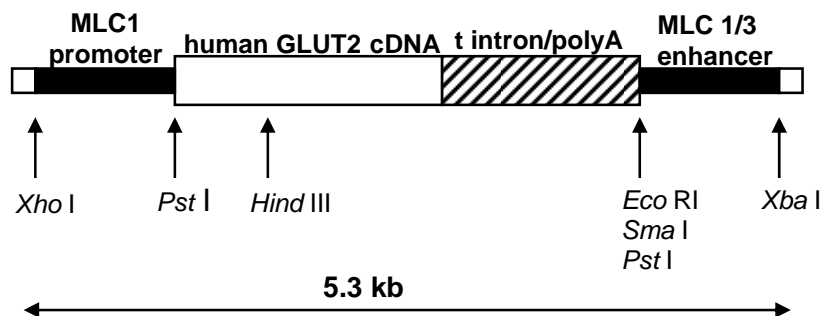


Figura 2. Representació esquemàtica del gen quimèric MLC/GLUT2. El fragment de 5.3 Kb *Xho*I-*Xba*I que contenia el gen quimèric complet es va microinjectar en el pronucli masculí d'embrions de ratolí.

1.2. ESTUDI DELS EFECTES PROVOCATS PER L'EXPRESSIÓ DE GLUT2 EN MÚSCUL ESQUELÈTIC D'ANIMALS TRANSGÈNICS.

A partir de les línies de transgènics establertes es va determinar l'expressió del gen quimèric i de la proteïna GLUT2, així com la localització subcel·lular del transportador.

Posteriorment, es va estudiar la seva funcionalitat mitjançant l'anàlisi de la captació de glucosa *in vivo* en el múscul esquelètic dels ratolins transgènics.

1.2.1. Anàlisi de l'expressió del gen quimèric MLC/GLUT2 en múscul esquelètic.

Per tal de determinar l'expressió del transgen es va obtenir RNA total de múscul esquelètic de ratolins control i transgènics, mantinguts en condicions normals d'alimentació. A continuació, es va analitzar la presència del mRNA del GLUT2 mitjançant Northern blot i posterior hibridació de les membranes amb el cDNA del GLUT2 humà com a sonda.

En el múscul esquelètic dels animals transgènics es va detectar un trànscrip de 2.5 Kb que hibridava amb la sonda de cDNA de GLUT2, com a resultat de l'expressió del transgen (Figura 3). Per contra, en els animals control no es van detectar trànscrips corresponents a GLUT2. Aquest resultat ens indicava que el gen quimèric es transcrivía a múscul esquelètic i que el mRNA de GLUT2 era estable. A més, es va observar que els animals transgènics de la línia Tg2 presentaven uns nivells superiors d'expressió del transgen respecte de la línia Tg1. Per tant, degut aquesta major expressió, es va decidir continuar la resta de l'estudi amb la línia d'animals transgènics Tg2.

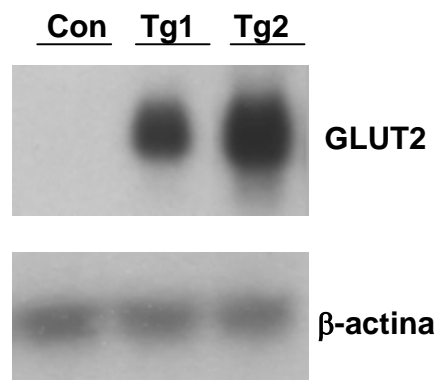


Figura 3. Expressió de GLUT2 en múscul esquelètic de ratolins transgènics MLC/GLUT2. Anàlisi per Northern blot dels nivells d'expressió del gen de GLUT2 en múscul. Es va aïllar RNA total de múscul d'animals control (Con) i transgènics (Tg) alimentats amb una dieta estàndard de laboratori. Les membranes es van hibridar amb la sonda del cDNA del GLUT2 humà. Es mostra un Northern blot representatiu.

1.2.2. Anàlisi de la presència de la proteïna GLUT2.

1.2.2.1. Anàlisi per Western blot.

Seguidament, en els animals amb major expressió del transgen (els animals de la línia Tg2), es va determinar la presència de proteïna GLUT2 a múscul esquelètic mitjançant anàlisi per Western blot. Es va fer un extracte de proteïna de múscul de ratolins controls i MLC/GLUT2 i es va detectar la presència de GLUT2 amb un anticòs específic pel transportador. Es va observar una banda corresponent al GLUT2 humà únicament al múscul esquelètic dels animals MLC/GLUT2, mentre que no es va detectar GLUT2 a múscul d'animals controls (Figura 4A). També es va determinar el contingut de proteïna GLUT4 en múscul esquelètic a partir d'una preparació de membranes. Es va observar que no hi havia diferències en els nivells de GLUT4 en ratolins transgènics MLC/GLUT2 respecte d'animals controls (Figura 4B). Això indicava que l'expressió del transportador GLUT2 en múscul esquelètic d'aquests animals no es compensava mitjançant un descens en els nivells del transportador GLUT4 característic d'aquest teixit.

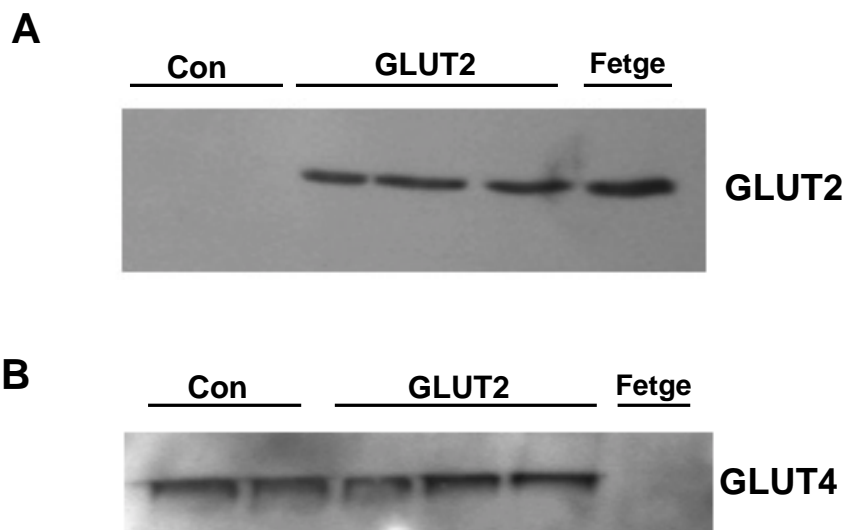


Figura 4. Expressió dels transportadors GLUT2 (A) i GLUT4 (B) en múscul esquelètic. (A) Es va obtenir proteïna total a partir de múscul *gastrocnemius* de ratolins controls i transgènics MLC/GLUT2, així com de fetge, i es va realitzar un Western blot. Després de la transferència, es va determinar l'expressió de GLUT2 per immunodetecció, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. **(B)** Es van aïllar membranes totals a partir de músculs *gastrocnemius* d'animals controls i transgènics MLC/GLUT2, així com de fetge, i es va realitzar un Western blot. Es va determinar l'expressió del transportador GLUT4 segons es descriu a Materials i Mètodes.

1.2.2.2. Estudi immunohistoquímic de l'expressió de la proteïna GLUT2.

Un cop comprovat que l'expressió del gen del GLUT2 humà es corresponia amb una expressió de la proteïna al múscul esquelètic de ratolins transgènics, es va voler estudiar la localització subcel.lular d'aquest transportador. Amb aquesta finalitat, es va realitzar la detecció immunohistoquímica de GLUT2 en talls transversals de músculs *gastrocnemius* de ratolins controls i ratolins transgènics MLC/GLUT2. Així, es van incubar els músculs amb l'anticòs específic per al GLUT2 humà, i aquest es va detectar visualitzant el senyal mitjançant fluorescència verda. Com a control es va utilitzar un marcatge de l'actina fibrilar amb faloidina (vermell). Es poden visualitzar els nuclis situats a les perifèries de les fibres (en blau), la qual cosa indicava que l'expressió del transgen no alterava la morfologia muscular ni causava processos de destrucció-regeneració que modificarien aquesta estructura característica. Es va observar que les fibres musculars dels animals transgènics presentaven fluorescència verda, corresponent al GLUT2, principalment al seu sarcolemma (Figura 5B). D'altra banda, no es va detectar senyal del GLUT2 en múscul esquelètic de ratolins controls (Figura 5A).

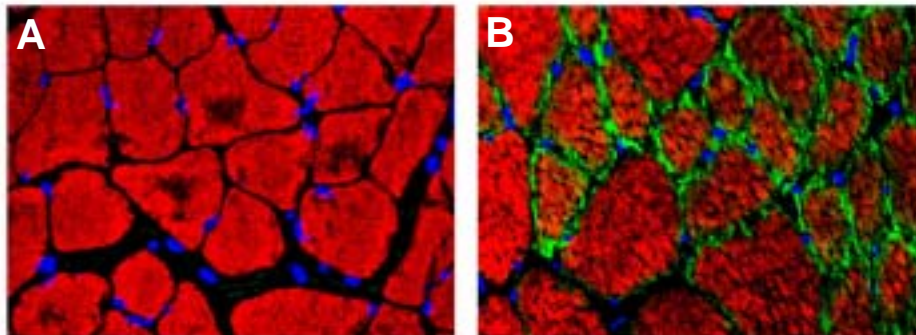


Figura 5. Anàlisi immunohistoquímica de l'expressió del transportador GLUT2 en múscul esquelètic. Es va determinar l'expressió del transportador GLUT2 (fluorescència verda) al sarcolemma i sarcoplasma de les fibres musculars dels *gastrocnemius* de ratolins controls (**A**) i transgènics MLC/GLUT2 (**B**), segons es descriu a Materials i Mètodes. L'actina fibrilar (vermell) va ser marcada amb faloidina. Es mostren talls transversals representatius en microscopia confocal.

1.2.3. Anàlisi de la captació de glucosa pel múscul esquelètic.

Després de comprovar que hi havia expressió del transportador al sarcolemma de les fibres musculars, es va analitzar si el múscul esquelètic dels ratolins que expressaven GLUT2 presentava un increment en la captació de glucosa. Per això es va injectar als ratolins 2-deoxiglucosa, un anàleg de la glucosa que pot ser captat i fosforilat però no pot ser metabolitzat més enllà i queda acumulat en forma de 2-deoxiglucosa-6-fosfat. Utilitzant 2-deoxiglucosa marcada radioactivament amb triti, i mesurant posteriorment les cpm acumulades a múscul esquelètic de ratolins controls i ratolins transgènics, es va observar un increment d'un 50% en la captació de 2-deoxiglucosa per part dels animals que expressaven GLUT2 respecte dels animals controls (Figura 6).

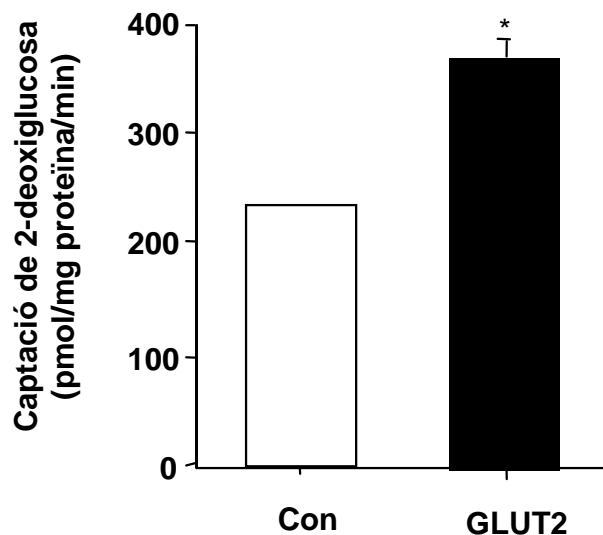


Figura 6. Captació de 2-deoxiglucosa en múscul esquelètic de ratolins transgènics MLC/GLUT2. Es va injectar per via intravenosa 1 μ Ci de l'anàleg de glucosa no metabolitzable 2-[1- 3 H]deoxi-D-glucosa en ratolins controls i transgènics alimentats. 30 min després de la injecció es van agafar mostres de músculs en els quals es va mesurar l'acumulació de compostos marcats radioactivament per un mètode prèviament validat (Ferré et al., 1985), tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats són les mitges \pm SEM de 3 animals a cada grup.

1.3. ESTUDI DELS EFECTES A NIVELL SISTÈMIC PROVOCATS PER L'EXPRESSIÓ DEL GLUT2.

Tot i l'increment en la captació de glucosa, per comprovar si l'expressió de GLUT2 en múscul produïa alteracions en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa *in vivo* en animals sans, es va determinar la concentració de glucosa en diferents condicions nutricionals. També es va determinar la concentració d'insulina, lactat i altres paràmetres sèrics, i es van realitzar tests de tolerància a glucosa i a insulina.

1.3.1. Anàlisi de les concentracions de glucosa, insulina, lactat i altres paràmetres sèrics.

A partir de mostres de sang obtingudes a primera hora del matí d'animals controls i transgènics alimentats o dejunats durant la nit es va determinar la concentració de glucosa sanguínia. La glucèmia dels animals transgènics MLC/GLUT2 de les dues línies estudiades era similar a la detectada en els ratolins controls en les diferents condicions d'alimentació (Taula 1).

Taula 1. Concentració sanguínia de glucosa (mg/dl)

	Alimentació	Dejú
Control	156±3	68±2
GLUT2	152±5	65±2

També es van mesurar els nivells d'insulina en sang, així com els metabòlits sèrics següents: lactat, àcids greixosos lliures (NEFAS), β -hidroxibutirat i triglicèrids. No es van observar diferències significatives en cap dels paràmetres sèrics estudiats (Taula 2) en ratolins transgènics MLC/GLUT2 respecte ratolins controls. Tot això indicava que l'increment en la captació de glucosa deguda a l'expressió de GLUT2 en múscul esquelètic no es traduïa en una alteració en la glucèmia ni en la insulinèmia, així com tampoc s'afectava a la concentració sèrica dels diferents metabòlits circulants estudiats.

Taula 2. Determinació dels paràmetres sèrics en alimentació.

	Insulina (ng/ml)	Lactat (mmol/l)	Triglicèrids (mg/dl)	NEFAS (mmol/l)	β-hidroxibutirat (mmol/l)
Control	1,48±0,2	5,01±0,1	152±14	0,91±0,06	0,46±0,04
GLUT2	1,28±0,1	5,06±0,2	143±8	1,07±0,07	0,43±0,06

1.3.2. Test de tolerància a la glucosa.

Amb la finalitat de determinar si l'expressió del transportador GLUT2 en el múscul esquelètic podria provocar canvis en l'homeòstasi de la glucosa després d'un subministrament exogen del sucre, es va realitzar un test de tolerància a la glucosa. Així, es va administrar una sobrecàrrega intraperitoneal de glucosa a ratolins controls i transgènics MLC/GLUT2 dejunats durant la nit. Els nivells basals de glucosa eren similars en els ratolins transgènics respecte dels controls (Figura 7). Després de 30 minuts de la injecció del sucre, els animals transgènics presentaven una reducció dels nivells de glucosa en sang (al voltant del 35%) respecte dels controls. L'augment dels nivells de glucosa circulant va ser transitori i gradualment es va retornar als nivells basals en 120 minuts, tant en els animals control com en els transgènics. Aquest augment en l'eliminació de glucosa en els animals transgènics que expressen el gen quimèric MLC/GLUT2, molt probablement, era el resultat de l'augment en la captació i utilització de glucosa pel múscul esquelètic. L'increment en la metabolització de la glucosa es podria explicar per l'efecte de l'expressió de GLUT2 en el múscul esquelètic d'aquests ratolins.

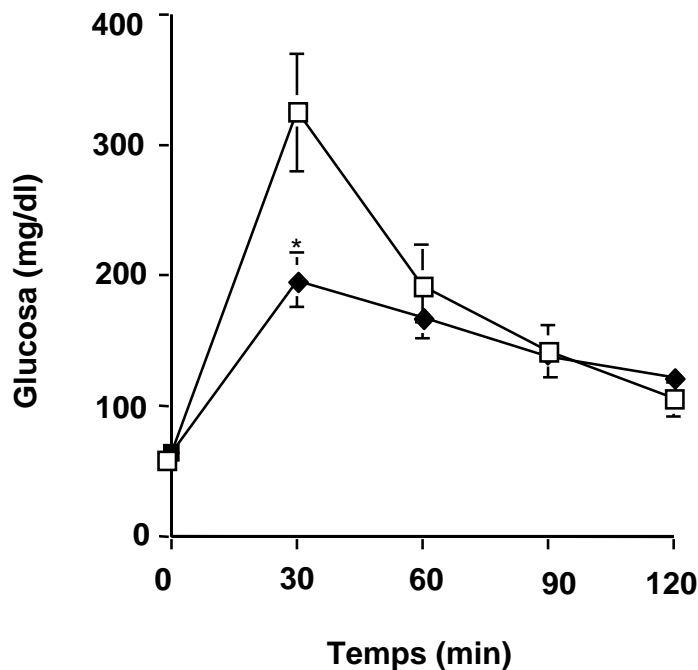


Figura 7. Test de tolerància a la glucosa. Ratolins control (□, n=14) i transgènics (◆, n=11) dejunats 16 h varen ser sotmesos a un test de tolerància a la glucosa. Es va administrar per via intraperitoneal 1 mg de glucosa per gram de pes viu i a continuació es varen realitzar determinacions de la concentració de glucosa en sang al llarg del temps, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats estan expressats com la mitja \pm SEM.

1.3.3. Test de tolerància a la insulina.

Amb la finalitat d'estudiar si els animals transgènics podrien ser més sensibles a la insulina que els animals controls, es va realitzar un test de tolerància a l'hormona. Per això, es va administrar als animals una dosi d'insulina intraperitoneal de 0.75 UI/kg pes. La resposta hipoglucèmica a l'administració de l'hormona observada en els ratolins transgènics va ser similar a la dels animals controls (Figura 8). Als 20 min de l'administració de la insulina, la glucèmia basal s'havia reduït un 50%, tant en els ratolins transgènics com en els controls. Als 60 min, ambdós grups mostraven valors propers al 75% de la glucèmia inicial. Aquests resultats indicaven que l'expressió de GLUT2 en múscul esquelètic no augmentava la sensibilitat a la insulina en els ratolins transgènics. No obstant, aquesta dosi d'insulina ja provoca una disminució de la glucèmia molt

acusada en els ratolins controls, de forma que les possibles diferències en la sensibilitat a l'hormona podrien quedar emmascarades.

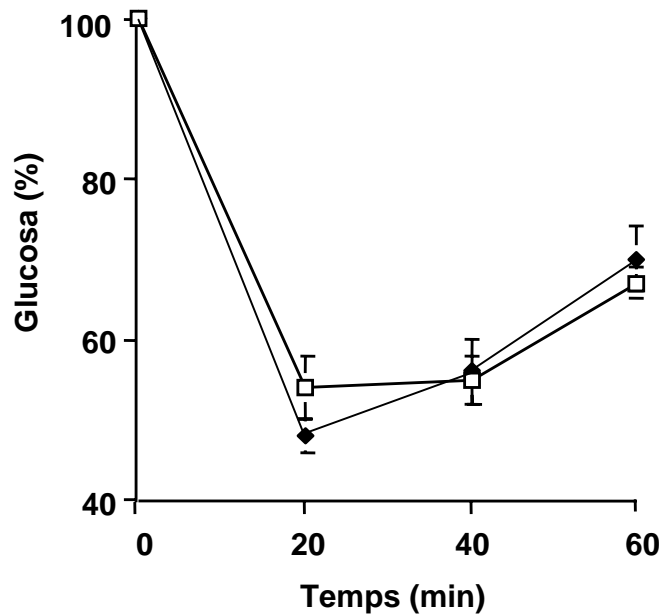


Figura 8. Test de tolerància a la insulina. Percentatge de disminució de la glucèmia respecte al temps. Es va injectar 0.75 U/Kg de pes d'insulina soluble a ratolins controls (□) i ratolins transgènics MLC/GLUT2 (◆). Les mostres de sang es van prendre a partir de la vena caudal dels animals en els temps indicats, i es va determinar la glucèmia tal com es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats són les mitges \pm SEM de 7 i 11 animals en cada grup respectivament.

Així doncs, en aquesta primera part de l'estudi, com un primer pas, es van obtenir ratolins transgènics que han incorporat al seu genoma el gen quimèric del GLUT2 humà sota el control del promotor MLC, i expressen el transportador al múscul esquelètic. A més, això es tradueix en l'expressió de la proteïna GLUT2 en múscul esquelètic d'animals transgènics, contràriament als ratolins controls, que no presenten el transportador en aquest teixit. El múscul esquelètic normalment expressa elevats nivells del transportador GLUT4 i nivells baixos de transportador GLUT1 (Kahn, 1996; Olson, 1996). En aquest estudi hem observat que l'expressió de GLUT2 en múscul esquelètic no es compensa amb una disminució del contingut de proteïna GLUT4, ja que animals controls i transgènics presentaven nivells similars del transportador en preparacions de membrana. D'altra banda, també es va estudiar la localització subcel.lular de GLUT2 mitjançant anàlisi immunohistoquímica. Així, els animals transgènics expressen el transportador

GLUT2 principalment al sarcolemma de les fibres musculars. Aquesta observació està d'acord amb el fet que GLUT2 és un transportador que s'expressa de forma constitutiva a la membrana cel·lular, contràriament a GLUT4, que en situació basal es localitza en vesícules intracel·lulars i només es transloca a membrana en resposta a estímuls com la insulina, les contraccions musculars o la hipòxia (Douen, 1989; Hirshman, 1990; Ploug, 1998).

Els ratolins transgènics que expressen GLUT2 en múscul esquelètic eren normoglicèmics i normoinsulinèmics. No obstant, aquests animals presentaven un increment en la captació de glucosa per aquest teixit, així com una millora en el test de tolerància a la glucosa, molt probablement degut a que l'expressió de GLUT2 augmentava el transport del sucre. El fet que aquest increment no es reflectís en una disminució de la concentració de glucosa sanguínia, ja sigui en condicions d'alimentació o de dejú, podria ser degut a un efecte compensatori de la resta de l'organisme per tal de mantenir una adequada homeòstasi. Per contra, en estudis previs on es va incrementar el contingut de transportadors a múscul mitjançant la sobreexpressió de GLUT1 (Marshall, 1993; Ren, 1993) o GLUT4 (Ikemoto, 1995; Ren, 1994; Treadway, 1994) es va obtenir una disminució de la glucèmia basal, així com un increment en els nivells de glucogen muscular. Aquestes diferències es podrien explicar, per una banda, pel nombre de còpies del transgen incorporades en els diferents models de transgènics. A més, contràriament als transportadors GLUT4 i GLUT1, el transportador GLUT2 té una elevada K_m per a la glucosa i la seva captació del sucre és proporcional a la concentració de glucosa extracel·lular quan aquesta és elevada. Per tant, podria ser que, degut a l'elevada K_m i la bidireccionalitat del transportador, en els ratolins transgènics que expressen GLUT2 a múscul, la glucosa surti de la cèl·lula quan la concentració intracel·lular de glucosa lliure excedeixi la capacitat fosforiladora de la HK. Així, molt probablement, en animals sans l'acció conjunta dels transportadors GLUT4, GLUT1 i, a més, GLUT2, faria que la concentració intracel·lular de glucosa superés la capacitat de fosforilar de la HK-II, que a més s'inhibeix per glucosa-6-P. Per tant, podria ser que aquesta glucosa lliure tornés a sortir de la cèl·lula mitjançant el GLUT2, la qual cosa faria que no s'alterés la glucèmia en animals sans.

Els ratolins transgènics MLC/GLUT2 tampoc presentaven una millora en la sensibilitat a la insulina respecte dels animals controls, com es va comprovar en un test de tolerància a l'hormona. Això és consistent amb el fet que GLUT2 no és un transportador sensible a la

insulina, com seria el cas del GLUT4, que es transloca a la membrana plasmàtica en resposta a l'hormona (Rea, 1997; Ploug, 1998). A més, la dosi d'insulina utilitzada provoca una estimulació molt elevada en els animals controls. Per altra banda, en els animals transgènics que expressen GLUT2 en múscul no s'observà l'aparició de resistència a la insulina, com en el cas dels transgènics que sobreexpressen GLUT1. Aquests animals tenen incrementada la captació basal de glucosa, però no es produeix un augment en el transport del sucre quan hi ha estimulació amb insulina (Gulve, 1994). Es creu que l'increment crònic en el flux de glucosa degut a la sobreexpressió de GLUT1 produeix un augment en els nivells de UDP-glucosa-N-Acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) (Buse, 1997), la qual cosa resulta en la O-GlcNAcilació de proteïnes de membrana. Entre aquestes podria haver-hi el GLUT4 o proteïnes associades a GLUT4, de forma que això contribuïria a la resistència a la insulina observada en aquest model (Buse, 2002). En el nostre estudi és molt probable que no es doni aquest efecte degut a què la bidireccionalitat i elevada Km de GLUT2 permeten la sortida de glucosa lliure, de manera que els nivells de UDP-GlcNAc possiblement no estarien incrementats. Tampoc s'ha observat un augment en els nivells d'hexosamines dels transgènics que sobreexpressen GLUT4 (Buse, 1997).

Una forma eficient d'evitar la sortida de glucosa podria ser la fosforilació intracel·lular ràpida. Per tant, es requereix una cooperació entre el transport de glucosa i la seva fosforilació per tal de mantenir un flux òptim d'entrada de glucosa a la cèl·lula. Així, per tal d'incrementar el transport i la fosforilació en animals transgènics, el pas següent en l'estudi va ser l'obtenció de ratolins dobles transgènics que expressaven GLUT2 i GK en múscul esquelètic.

1.4. OBTENCIÓ DE RATOLINS DOBLES TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN GLUT2 I GK EN MÚSCUL ESQUELÈTIC.

En el nostre laboratori s'havia obtingut prèviament una línia de ratolins que expressava l'enzim glucoquinasa (GK) en múscul esquelètic, sota el control del promotor de la cadena lleugera de la miosina (MLC) (Otaegui, 2000). Aquests animals transgènics MLC/GK presentaven un increment en la captació de glucosa pel múscul esquelètic i una reducció de la hiperglucèmia diabètica. A més, la injecció d'insulina a ratolins transgènics que expressen GK en múscul tractats amb STZ portava a normoglucèmia, mentre que els ratolins control tractats amb STZ es mantenien altament hiperglucèmics, suggerint una

major sensibilitat a l'efecte de l'hormona per part dels ratolins transgènics. Tanmateix, el descens en els nivells de transportadors de glucosa al múscul esquelètic durant la diabetis podria ser responsable de la manca d'una normalització completa de la hiperglucèmia en aquests ratolins. Així, l'expressió de GLUT2 en múscul esquelètic de ratolins transgènics que expressen GK podria resultar en un increment en el transport de glucosa per aquest teixit. En aquesta part de l'estudi, es van generar ratolins dobles transgènics que expressaven ambdós, GLUT2 i GK, amb l'objectiu d'incrementar la captació de glucosa muscular i, donat el cas, determinar si aquests animals contrarestarien la hiperglucèmia diabètica.

1.4.1. Generació de ratolins dobles transgènics.

Per tal d'obtenir els animals dobles transgènics emprats en aquest estudi, es van encreuar ratolins transgènics MLC/GK amb ratolins transgènics MLC/GLUT2, tots dos congènics amb la soca C57Bl6/SJL. De la primera generació es van obtenir els quatre genotips:



1.5. ESTUDI DE L'EFECTE DE LA INDUCCIÓ DE DIABETIS EXPERIMENTAL EN ELS RATOLINS DOBLES TRANSGÈNICS GLUT2+GK.

A continuació, es va determinar si l'expressió del transportador GLUT2 en múscul esquelètic de ratolins que expressen GK produïa un increment en la captació de glucosa i

permetia una normalització de la hiperglucèmia diabètica. Amb aquest objectiu, es va procedir a la injecció de dosis múltiples de STZ en la primera generació d'animals dobles transgènics GLUT2+GK. Així, es van tractar animals mascles de 2 mesos d'edat amb 5 dosis consecutives de 45 mg de STZ/kg per tal d'induir diabetis experimental. L'aparició de la diabetis es va confirmar mitjançant un seguiment de la glucèmia dels animals al llarg de l'estudi.

1.5.1. Estudi de l'expressió dels gens del GLUT2 i la GK en el múscul d'animals tractats amb STZ.

Els nivells d'expressió dels transgens del GLUT2 i la GK en múscul esquelètic dels animals tractats amb STZ van ser analitzats per Northern blot. Es va detectar un transcrit que hibridava amb la sonda del GLUT2 tant en els ratolins dobles transgènics GLUT2+GK com en els ratolins transgènics MLC/GLUT2, mentre que no es va detectar mRNA de GLUT2 en múscul esquelètic d'animals control (Figura 9). A més, un transcrit que hibridava amb una sonda per la GK només va ser detectat en els dobles transgènics GLUT2+GK. Això indicava que els ratolins dobles transgènics tractats amb STZ expressaven tant el transportador GLUT2 com l'enzim GK en múscul esquelètic.

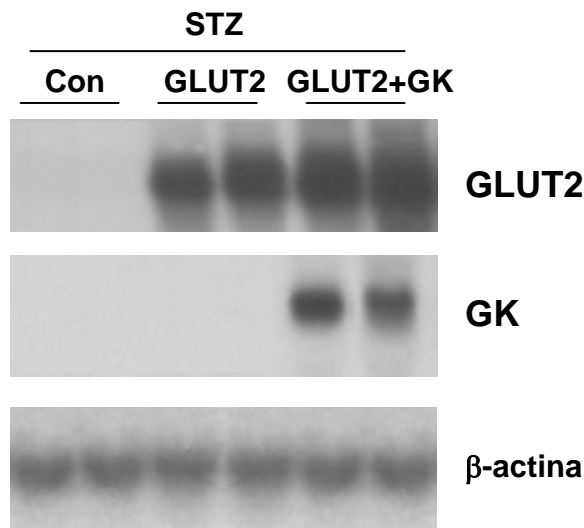


Figura 9. Expressió de GLUT2 i GK en múscul esquelètic de ratolins dobles transgènics MLC/GLUT2-MLC/GK tractats amb STZ. Anàlisi per Northern blot dels nivells d'expressió del gen del GLUT2 i de la GK en múscul. Es va aïllar RNA total de múscul d'animals control (Con), animals transgènics MLC/GLUT2 (GLUT2) i animals dobles transgènics MLC/GLUT2-MLC/GK (GLUT2+GK). Es va hibridar amb sondes corresponents als cDNAs del GLUT2 humà i la GK de rata. Per tal d'estandaritzar es va hibridar amb β -actina. Es mostra un Northern blot representatiu.

1.5.2. Anàlisi de la glucèmia.

A partir de mostres de sang obtingudes a primera hora del matí d'animals controls i transgènics alimentats o dejunats durant la nit es va determinar la concentració de glucosa plasmàtica. Ratolins control tractats amb STZ, en alimentació o en dejú, mostraven hiperglucèmia 6 setmanes després del tractament (Figura 10A). Igualment, ratolins que expressen GLUT2 tractats amb STZ mostraven nivells de glucosa sanguínia elevats. Així, l'expressió de GLUT2 en múscul esquelètic no permetia reduir la hiperglucèmia en condicions de dejuni o d'alimentació. Tanmateix, els ratolins transgènics MLC/GK tractats amb STZ presentaven nivells de glucosa sanguínia inferiors (disminució al voltant del 25%) que els controls o els transgènics MLC/GLUT2 tractats amb STZ (Figura 10). A més, ratolins transgènics MLC/GK tractats amb STZ dejunats durant la nit tenien nivells de glucosa sanguínia menors (disminució del 40%) que els que presentaven ratolins control diabètics dejunats (Figura 10B). Resultats semblants es van observar en ratolins dobles transgènics que expressaven GK+GLUT2 tractats amb STZ. Així, l'expressió de GK i GLUT2 en múscul esquelètic portava a una reducció parcial de la hiperglucèmia sota ambdues condicions, dejuni (40%) i alimentació (25%). No obstant, no s'observaven diferències en la glucèmia dels ratolins dobles transgènics respecte els animals que únicament expressaven GK en múscul esquelètic. Això indicava que la presència del transportador GLUT2 no millorava l'efecte aconseguit mitjançant l'expressió de GK en múscul.

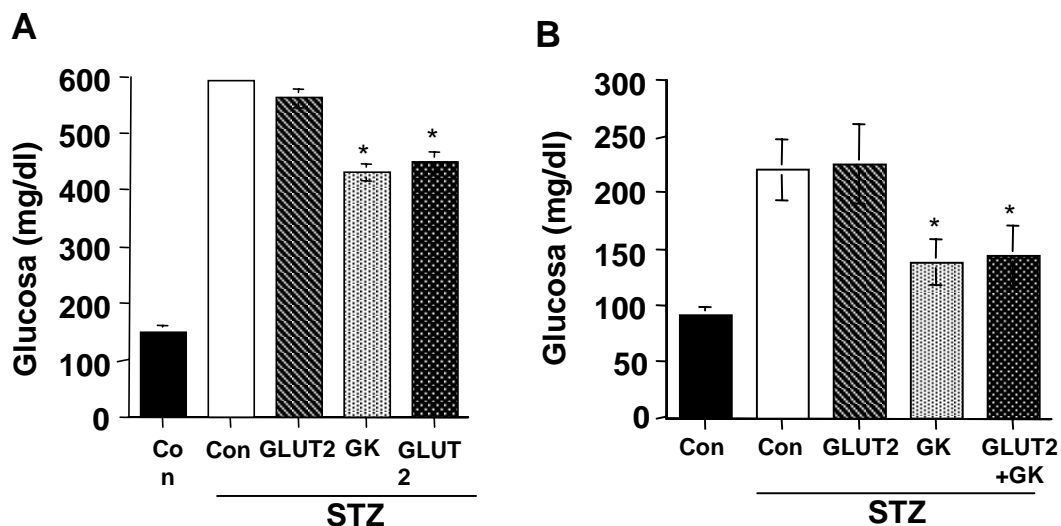


Figura 10. Anàlisi de la glucèmia en alimentació (A) i en dejú (B). Sis setmanes després del tractament amb STZ es van determinar els nivells de glucosa en sang en alimentació (A) i després d'un dejú de 16 hores (B), tal i com s'indica a Materials i mètodes. Es representa la mitja \pm SEM. (Con, control; GLUT2, Tg MLC/GLUT2; GK, Tg MLC/GK; GLUT2+GK; doble Tg MLC/GLUT2-MLC/GK).

1.5.3. Test de tolerància a la insulina.

Amb la finalitat de determinar si els ratolins dobles transgènics GLUT2+GK diabètics eren més sensibles a l'efecte hipoglucemiànt de la insulina, es va realitzar un test de tolerància a l'hormona. Quan es va injectar intraperitonealment una dosi baixa (0.75 UI/Kg pes) d'insulina a ratolins desperts tractats amb STZ, es va detectar un descens notable en la concentració sanguínia de glucosa en ratolins dobles transgènics i transgènics MLC/GK, mentre que no es va detectar cap canvi significatiu en la hiperglucèmia en ratolins transgènics MLC/GLUT2 respecte ratolins control (Figura 11). Així, l'expressió de GLUT2 en múscul esquelètic de ratolins transgènics no permetia contrarestar la hiperglucèmia diabètica després del tractament amb dosis baixes d'insulina. En canvi, ratolins dobles transgènics GK+GLUT2 i transgènics MLC/GK tractats amb STZ eren més sensibles als efectes hipoglucemiants de la insulina. No obstant, no es van trobar diferències significatives entre ratolins transgènics que expressaven GK en múscul esquelètic tractats amb STZ i ratolins dobles transgènics que expressaven ambdós GK i GLUT2 en múscul esquelètic tractats amb STZ. Això suggeria que la presència de GLUT2 en múscul esquelètic no millorava substancialment la captació de glucosa en ratolins diabètics que expressen GK.

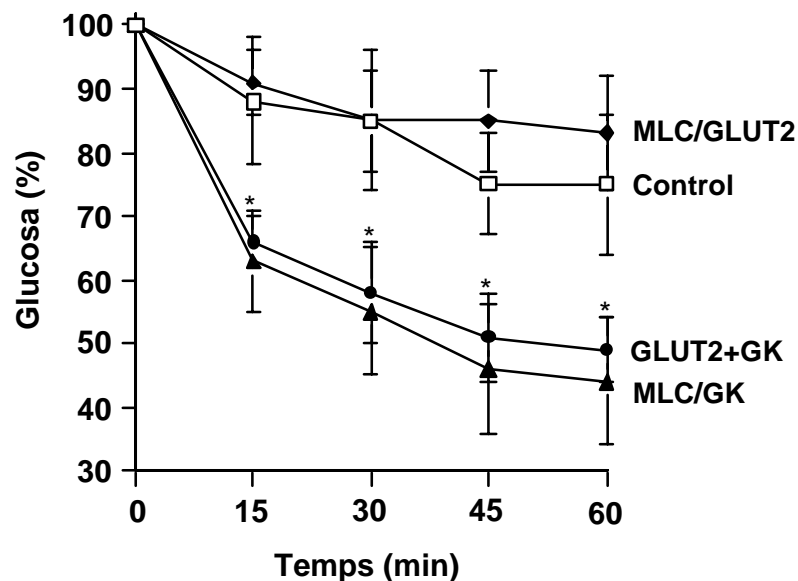


Figura 11. Test de tolerància a la insulina. Percentatge de disminució de la glucèmia respecte al temps. Es va injectar 0.75 U/Kg de pes d'insulina soluble a ratolins controls (□), ratolins transgènics MLC/GK (▲), ratolins transgènics MLC/GLUT2 (◆) i dobles transgènics GLUT2+GK (●). Les mostres de sang es van prendre a partir de la vena caudal dels animals en els temps indicats, i es va determinar la glucèmia tal com es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats són les mitges \pm SEM de 8 animals en cada grup.

Així doncs, en aquest estudi, per tal d'intentar contrarestar la hiperglucèmia diabètica ens vam plantejar incrementar el transport i la fosforilació en múscul esquelètic. S'havia descrit prèviament que l'expressió de GLUT4 en múscul esquelètic resultava en una lleugera disminució de la hiperglucèmia diabètica, probablement degut a una alteració limitant en la fosforilació de la glucosa. No obstant, la sobreexpressió d'ambdós, GLUT4 i HKII en músculs de ratolins dobles transgènics no millorava la tolerància a la glucosa o l'acció de la insulina en comparació als animals transgènics que sobreexpressaven únicament GLUT4 (Lombardi, 1997). A més, la sobreexpressió d'HKII en múscul esquelètic de ratolins transgènics que sobreexpressen GLUT1 no produïa un increment addicional en la captació global de glucosa (Hansen, 2000). Això podria ser degut a una inhibició de l'enzim HKII pel seu producte, la glucosa-6-P. En el nostre estudi es va triar l'enzim GK perquè, contràriament a l'HKII, té una elevada Km per glucosa i la seva activitat no és inhibida per glucosa-6-P a concentracions fisiològiques. A més, presenta una cinètica sigmoïdal de cooperativitat amb glucosa, la qual cosa el fa molt més sensible a les concentracions de glucosa del medi (Ilyedjian, 1993; Printz, 1993). Així, s'ha observat que l'expressió de GK en múscul esquelètic de ratolins transgènics (Otaegui, 2000) o en rates transfectades amb adenovirus (Jiménez-Chillarón, 1999) incrementa la captació de glucosa i redueix la hiperglucèmia diabètica. Per tant, en aquest treball, es va estudiar si l'expressió conjunta de GLUT2 i GK permetia aconseguir una millora en aquesta reducció de la hiperglucèmia obtinguda prèviament en animals transgènics MLC/GK.

En animals dobles transgènics diabètics es va observar que no s'alterava l'expressió d'ambdós, el transportador GLUT2 i l'enzim GK, en múscul esquelètic. Això és consistent amb el fet que els transgens es troben sota el control del promotor MLC, que s'expressa constitutivament a múscul esquelètic i no està regulat pels nivells d'insulina circulant. A més, s'observava una disminució de la hiperglucèmia en ratolins dobles transgènics GLUT2+GK tractats amb STZ. No obstant, aquesta disminució era similar a l'obtinguda amb ratolins transgènics que expressen únicament GK en múscul esquelètic, de forma que només s'aconseguia una reducció parcial de la hiperglucèmia. Normalment el múscul esquelètic expressa els transportadors GLUT1 i GLUT4. GLUT2 és membre de la mateixa família de transportadors passius, i mostra un elevat grau d'homologia i una estructura proteica similar. Però, tot i aquestes similituds, diversos estudis suggereixen que les isoformes de GLUT no són intercanviables entre si, i que les característiques de GLUT2 li permetrien dur a terme funcions especialitzades (Bell, 1990; Mueckler, 1994; Thomas,

1992). A més, és molt probable que l'increment de la captació i utilització de la glucosa únicament pel múscul esquelètic mitjançant un augment en el transport i fosforilació del sucre no sigui suficient per contrarestar els efectes de la diabetis sobre altres teixits de l'organisme. En la diabetis, l'absència d'insulina dóna lloc a una inhibició de la captació i utilització de la glucosa pel fetge, així com a un increment de la producció hepàtica del sucre (Pilkis, 1992). També es produeix un augment de la lipòlisi i disminució de la captació de triglicèrids en el teixit adipós, la qual cosa incrementa els nivells circulants de triglicèrids i d'àcids greixosos lliures. Aquests àcids greixosos són oxidats al fetge per produir cossos cetònics, donant com a resultat una cetoacidosi diabètica (Miles, 1980). Per tant, juntament amb l'increment de la captació de glucosa pel múscul, probablement seria necessari l'efecte de la insulina per tal d'aconseguir una completa normalització de la malaltia.

En aquest sentit, s'havia descrit que el tractament amb dosis baixes d'insulina en animals diabètics que expressaven GK en múscul esquelètic portava a una normalització de la glucèmia (Otaegui, 2000). Els animals dobles transgènics GLUT2+GK també eren més sensibles als efectes hipoglucèmics de l'hormona, però no es diferenciaven dels ratolins transgènics que expressen únicament GK. Per tant, tots aquests resultats indicaven que la presència de GLUT2 en múscul esquelètic no millorava substancialment la captació de glucosa en ratolins diabètics que expressen GK. És possible que, *in vivo*, es produeixi algun mecanisme compensatori que emmascari o contraresti els efectes potencials de l'expressió d'ambdós, GLUT2 i GK, en múscul esquelètic.

Prèviament, en el nostre laboratori, estudis amb ratolins transgènics que expressen insulina en múscul esquelètic han mostrat que la fosforilació de glucosa és la principal limitació per a la reducció de la hiperglucèmia diabètica (Riu, 2002). D'altra banda, els ratolins que expressen GK en múscul esquelètic presenten una millora en la hiperglucèmia diabètica, però no s'aconsegueix una normalització completa, probablement degut a una limitació en el transport de la glucosa (Otaegui, 2000). L'absència d'insulina dóna lloc a una disminució dels nivells de GLUT4 i del transport de glucosa insulino-dependent, i es redueix el flux d'entrada del sucre cap a l'interior de la cèl.lula muscular (Kahn, 1992; Burcelin, 1993; Napoli, 1995). Així, l'expressió de GK en múscul esquelètic juntament amb l'acció de la insulina per incrementar el transport del sucre mitjançant el transportador GLUT4 podria compensar les limitacions observades en

els casos anteriors. En el nostre laboratori havíem observat que ratolins transgènics que coexpressen insulina i glucoquinasa en múscul esquelètic presenten una normalització de la glucèmia deguda a un increment en la captació i utilització de la glucosa per aquest teixit (Mas, 2003). En aquest estudi hem confirmat que, amb dosis baixes de l'hormona, que no produeixen un efecte hipoglucèmic important sobre els animals controls, sí que s'aconsegueix una normalització de la glucèmia en transgènics que expressen GK en múscul. Per tant, l'expressió de glucoquinasa en múscul esquelètic permetria reduir la dosi d'insulina exògena administrada per tal de disminuir la hiperglucèmia diabètica.

Així doncs, aquestes observacions confirmaven que la GK jugava un paper clau en la disminució de la hiperglucèmia diabètica mitjançant un increment en la fosforilació i la captació de glucosa pel múscul, però demostraven que l'expressió de GLUT2 no millorava l'acció de la GK. L'expressió de l'enzim en múscul esquelètic es pot aconseguir mitjançant diversos procediments. Així, en l'apartat que es descriu a continuació es va realitzar una aproximació *ex vivo* consistent en l'obtenció de cèl·lules musculars manipulades en cultiu per tal d'expressar l'enzim GK i el seu posterior trasplantament a ratolins diabètics.

2. CONTRARESTACIÓ DEL PROCÉS DIABÈTIC PER TRASPLANTAMENT DE CÈL·LULES MUSCULARS QUE EXPRESSEN GK.

Per tal d'aconseguir una millor aproximació per disminuir la hiperglucèmia, en aquesta part de l'estudi s'examinà si cèl·lules musculars genèticament manipulades per expressar GK podien eliminar l'excés de glucosa de la sang, sense causar hipoglucèmia, en ser trasplantades a animals diabètics. Aquesta podria constituir una nova aproximació de teràpia gènica *ex vivo* per disminuir la hiperglucèmia diabètica.

2.1. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES MUSCULARS QUE EXPRESSEN GK.

Amb la finalitat d'estudiar els efectes de l'expressió de la GK en cèl·lules musculars en cultiu, es van transfectar mioblasts de ratolí C₂C₁₂ de forma estable amb un gen quimèric que contenia el promotor de la cadena lleugera de la miosina (MLC), específic de múscul, unit a la glucoquinasa de rata. Aquest gen quimèric era el mateix que es va utilitzar per obtenir els ratolins transgènics que expressen GK en múscul esquelètic (Otaegui, 2000).

La línia C₂C₁₂ és un subclon de la línia de múscul esquelètic C₂, que va ser establerta a partir del múscul en regeneració dels ratolins C3H (Yaffe, 1977; Blau, 1983). Es van utilitzar mioblasts C₂C₁₂ perquè es divideixen ràpidament, poder ser transfectats establement i es diferencien a miotubs canviant la concentració de sèrum al medi. A més, aquestes cèl·lules poden sobreviure *in vivo* quan són encapsulades i trasplantades, i són molt utilitzades en protocols de teràpia gènica com a vehicle per l'alliberament sistèmic de proteïnes recombinants (Barr, 1991; Dhawan et al., 1991; Dai et al., 1992; Deglon et al., 1996; Rinsch et al., 1997).

2.1.1. Transfecció de cèl·lules C₂C₁₂ amb el gen quimèric MLC/GK.

S'ha descrit que l'*enhancer* del gen de la MLC activa la transcripció del gen de la MLC en cèl·lules musculars en cultiu (Donoghue, 1988; Wentworth, 1991). Aquesta activació es troba restringida només als miotubs diferenciats, en els quals el seu efecte sobre la transcripció és unes 100 vegades més elevat que l'efecte detectat en mioblasts no diferenciats o en tipus cel·lulars no musculars (Rosenthal, 1989).

Per tal d'obtenir cèl.lules musculars que expressessin l'enzim GK, es va realitzar la transfecció estable de les cèl.lules de mioblast C_2C_{12} amb el plasmidi que contenia el gen quimèric MLC/GK (Figura 12). La presència del gen quimèric es va detectar mitjançant anàlisi per PCR (dades no mostrades).

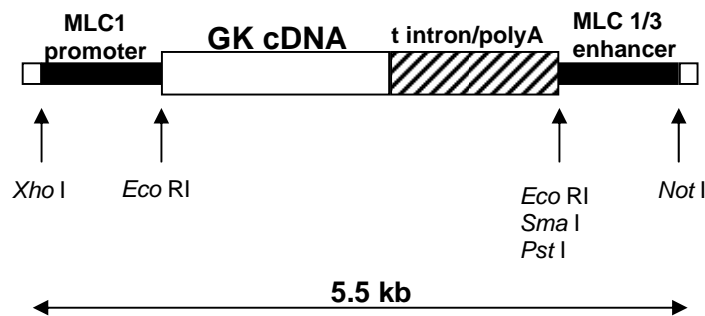


Figura 12. Representació esquemàtica del gen quimèric MLC/GK.

2.1.2. Anàlisi de l'expressió de la GK en cèl.lules C_2C_{12} .

A continuació, es va analitzar l'expressió del gen de la GK en els clons positius mitjançant Northern blot. Per a la realització d'aquest estudi es va seleccionar el clon de cèl.lules C_2C_{12} que mostrava un major nivell d'expressió de GK, i es va anomenar C_2C_{12} GK. Com a control es van utilitzar cèl.lules de mioblast C_2C_{12} no transfectades.

Així, per tal de determinar l'expressió de la GK, es va obtenir RNA total de cèl.lules C_2C_{12} GK i C_2C_{12} abans i després de la diferenciació. En els miotubs C_2C_{12} GK diferenciats es va detectar la presència d'un transcrit que hibridava amb la sonda de la GK, mentre que no es va trobar expressió en miotubs control C_2C_{12} no transfectats (Figura 13) ni en mioblasts C_2C_{12} GK no diferenciats. A més, es va utilitzar l'expressió del gen de la miogenina com a marcador de diferenciació dels mioblasts. D'altra banda, els miotubs C_2C_{12} GK mostraven un increment en l'expressió del transportador de glucosa GLUT1 (Figura 13). En canvi, no es va detectar expressió del transportador GLUT4 en miotubs C_2C_{12} ni en miotubs C_2C_{12} GK (dades no mostrades). El senyal de la β -actina es va utilitzar per corregir diferències de càrrega.

Per tant, els resultats obtinguts indicaven que la diferenciació dels mioblasts C₂C₁₂GK a miotubs induïa l'expressió del gen de la GK i incrementava l'expressió del transportador GLUT1.

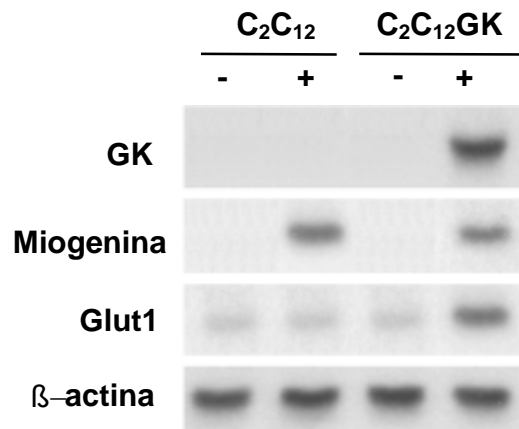


Figura 13. Estudi dels nivells d'expressió del gen quimèric MLC/GK. Es va aïllar RNA total de cèl.lules C₂C₁₂ i C₂C₁₂GK diferenciades (+) o no diferenciades (-). Les membranes es van hibridar amb sondes corresponents a la GK, miogenina, GLUT1 i β-actina. Es mostra un Northern blot representatiu.

2.2. ESTUDI *IN VITRO* DELS EFECTES DE L'EXPRESSIÓ DE GK EN CÈL.LULES MUSCULARS C₂C₁₂.

2.2.1. Determinació de l'activitat GK.

Amb la finalitat de detectar la presència de GK activa després de la diferenciació dels mioblasts C₂C₁₂GK, es va determinar l'activitat GK en cèl.lules en cultiu i en extractes hepàtics de ratolí alimentat (Figura 14). Així, es va observar que els miotubs C₂C₁₂GK mostraven un increment de 1.5 vegades en l'activitat glucoquinasa respecte els resultats obtinguts en extractes hepàtics de ratolí. Per contra, no es va detectar activitat GK en miotubs control C₂C₁₂. Aquests resultats indicaven que el promotor de la MLC induïa l'expressió del gen de la GK en miotubs i que, a més, aquests miotubs eren capaços de sintetitzar l'enzim en la seva forma activa.

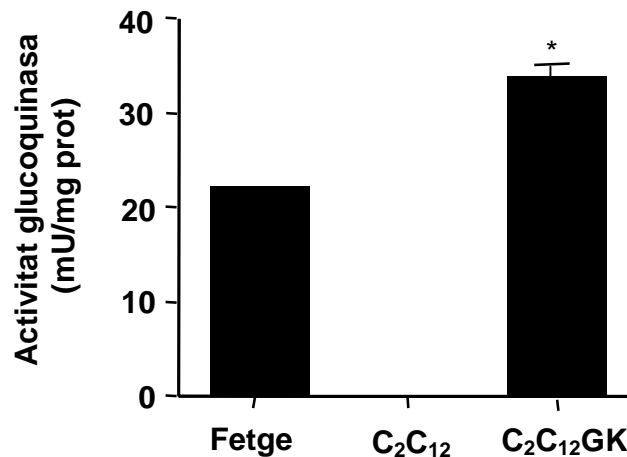


Figura 14. Activitat GK en miotubs C₂C₁₂GK. L'activitat GK va ser determinada en extractes de cèl.lules C₂C₁₂ i C₂C₁₂GK diferenciades i també en fetge de ratolins alimentats segons s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats representen les mitges \pm SEM de tres experiments independents realitzats en plaques per triplicat (* $p < 0.05$ vs. C₂C₁₂).

Degut a aquesta activitat GK, els miotubs C₂C₁₂GK presentaven un increment de 1.5 vegades en l'activitat fosforiladora de glucosa total en comparació amb els miotubs control C₂C₁₂ (98 ± 2 vs. 64 ± 4 mU/mg proteïna). A més, aquest increment en l'activitat GK anava associat a un augment en les concentracions intracel.lulars de glucosa-6-fosfat i lactat. Així, en comparació amb els miotubs control C₂C₁₂, els miotubs C₂C₁₂GK incubats amb glucosa 20mM incrementaven 2.8 vegades els nivells de glucosa-6-fosfat (8 ± 0.3 vs. 23 ± 0.7 nmol/mg proteïna) i 1.8 vegades els nivells de lactat (5 ± 0.9 vs. 9 ± 0.3). També es va observar un augment de 3 vegades en la incorporació de glucosa a glucogen en miotubs C₂C₁₂GK respecte els miotubs control C₂C₁₂ (Figura 15).

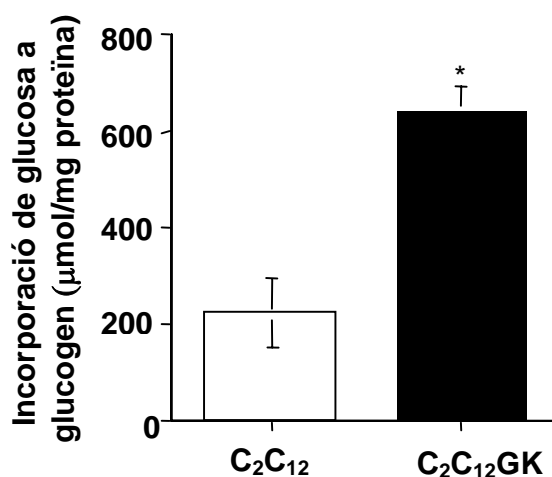


Figura 15. Incorporació de glucosa a glucogen en miotubs C₂C₁₂GK. Cèl.lules C₂C₁₂ i C₂C₁₂GK van ser diferenciades i incubades amb glucosa marcada radioactivament amb ¹⁴C. Posteriorment es va aïllar el glucogen acumulat a les cèl.lules i es va mesurar la radioactivitat incorporada segons es descriu a Materials i Mètodes.

2.2.2. Efecte de l'expressió de la GK sobre la captació de glucosa i producció de lactat.

Per tal d'estudiar l'activitat biològica de la GK expressada per les cèl.lules C₂C₁₂GK, es va analitzar la captació i utilització de la glucosa per part d'aquests miotubs. Així, després de 2 dies de diferenciació, les cèl.lules es van incubar durant la nit amb medi lliure de sèrum i 20 mM de glucosa. El dia següent, les cèl.lules es van incubar amb el mateix medi amb glucosa a diferents concentracions durant els temps indicats, i es van mesurar els metabòlits al medi de cultiu. Es va observar un augment en la captació de glucosa i l'alliberament de lactat al medi en miotubs C₂C₁₂GK (Figura 16) respecte miotubs control C₂C₁₂. A més, aquest increment en el consum de glucosa era dependent de la concentració del sucre present al medi de cultiu. Així, a 5 mM de glucosa els miotubs C₂C₁₂GK mostraven un augment de 1.6 vegades en el consum de glucosa, mentre que a 7, 10 o 20 mM de glucosa el consum va incrementar en 2, 2.4 i 3 vegades, respectivament (Figura 16). També es va observar un increment glucosa-dependent en la producció de lactat per part d'aquests miotubs. Així doncs, aquests resultats indicaven que la GK produïda pels miotubs C₂C₁₂GK era biològicament activa i actuava regulada per la concentració de glucosa del medi.

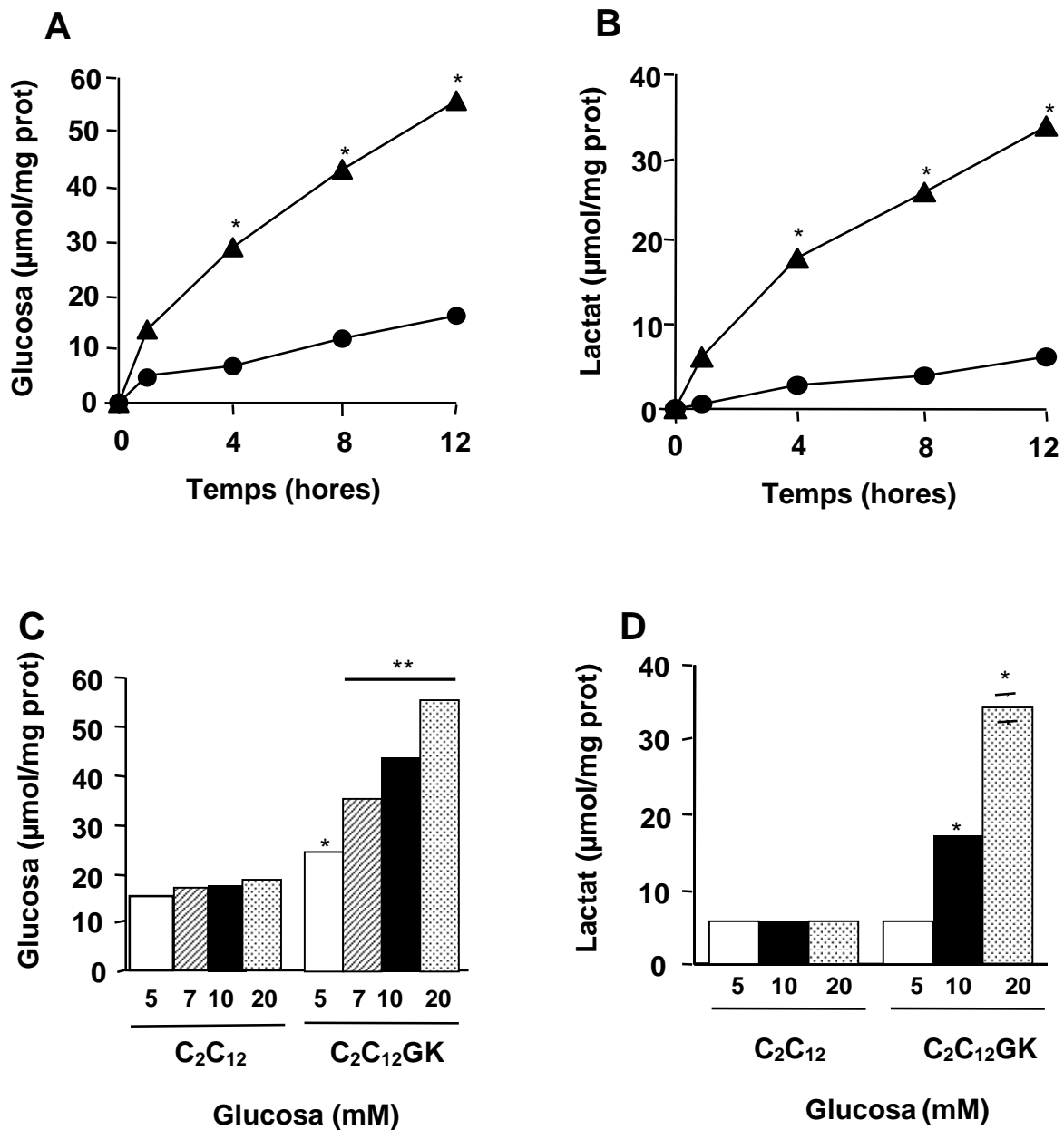


Figura 16. Efecte de l'expressió de GK sobre la captació de glucosa i la producció de lactat en miotubs C₂C₁₂GK. (A) Consum de glucosa i (B) alliberament de lactat al medi per les cèl.lules C₂C₁₂ (●) i C₂C₁₂GK (▲) diferenciades cultivades en glucosa 20 mM. Als temps indicats es van obtenir alíquotes de medi i es van determinar les concentracions de glucosa i lactat, tal com s'indica a Materials i Mètodes. (C i D) Increment glucosa-dependent en (C) el consum de glucosa i (D) la producció de lactat. Cèl.lules C₂C₁₂ i C₂C₁₂GK diferenciades van ser cultivades en medi amb concentracions creixents de glucosa durant 12 hores. Posteriorment es van determinar les concentracions de glucosa i de lactat, tal com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats representen la mitja ± SEM de tres experiments separats realitzats en plaques per triplicat.

2. 3. ESTUDI *IN VIVO* DE L'EXPRESSION DE GK EN CÈL.LULES MUSCULARS C₂C₁₂GK.

2.3.1. Trasplantament de cèl.lules C₂C₁₂GK a la cavitat peritoneal de ratolins C3H.

Després de caracteritzar els miotubs C₂C₁₂GK *in vitro* es va determinar el seu efecte *in vivo*. Les cèl.lules de mioblast C₂C₁₂ s'han obtingut a partir de múscul esquelètic de ratolins de la soca C3H. Per tant, es van trasplantar miotubs C₂C₁₂ o C₂C₁₂GK a la cavitat intraperitoneal de ratolins C3H sans. No es van observar diferències en els nivells de glucosa sanguínia en estat d'alimentació entre ratolins no trasplantats (grup control) i ratolins trasplantats amb miotubs C₂C₁₂ o C₂C₁₂GK (Figura 17). D'altra banda, els nivells sèrics d'insulina d'aquests ratolins eren de 2.4±0.6 ng/ml. A més, es va observar que el trasplantament de miotubs C₂C₁₂GK no provocava hipoglucèmia en ratolins en estat de dejú (dades no mostrades). Els nivells sèrics de lactat en ratolins trasplantats amb miotubs C₂C₁₂GK eren similars als dels ratolins control (5±1 vs. 5±1). Així doncs, tots aquests resultats suggerien que el trasplantament de miotubs C₂C₁₂GK en ratolins C3H sans permetia un manteniment de la normoglucèmia, sense l'aparició d'episodis d'hipoglucèmia.

Tres setmanes després del trasplantament de les cèl.lules, els ratolins van ser tractats amb STZ amb la finalitat de determinar si els miotubs C₂C₁₂GK prevenien l'aparició de la hiperglucèmia diabètica. Dues setmanes després de l'última injecció de STZ, els ratolins no trasplantats i els receptors de miotubs C₂C₁₂ van desenvolupar una elevada hiperglucèmia (més de 600 mg/dl, el límit superior de detecció) i hipoinsulinèmia (menys de 0.4 ng/ml d'insulina). En canvi, els animals trasplantats amb C₂C₁₂GK contrarestaven la hiperglucèmia diabètica (Figura 17), tot i que eren hipoinsulinèmics (menys de 0.4 ng/ml).

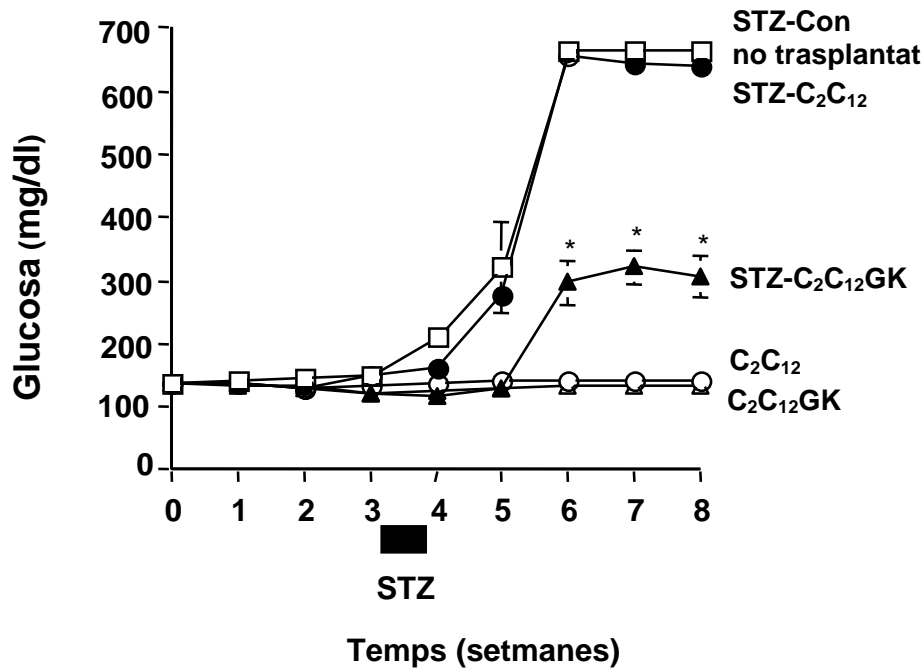


Figura 17. Trasplantament de cèl·lules C₂C₁₂GK diferenciades a la cavitat peritoneal de ratolins C3H: nivells de glucosa sanguínia. Es va determinar la glucèmia en ratolins alimentats sans no injectats (□) o injectats amb miotubs C₂C₁₂ (○) o C₂C₁₂GK (△). Tres setmanes després del trasplantament, es va induir diabetis per tractament amb STZ en ratolins no trasplantats (□) i en els receptors de miotubs C₂C₁₂ (●) o C₂C₁₂GK (▲). Els resultats es van representar com la mitja ± SEM. 16 ratolins van ser trasplantats amb C₂C₁₂ i 16 més amb C₂C₁₂GK. 8 ratolins trasplantats en cada cas i 5 animals no trasplantats van ser posteriorment tractats amb STZ. (*p<0.05 vs. C₂C₁₂).

També es va observar que els nivells sèrics de lactat de ratolins trasplantats amb miotubs C₂C₁₂GK (4.5 ± 1 mM) eren similars als de ratolins sans, mentre que els de ratolins no trasplantats i receptors de miotubs C₂C₁₂ eren un 40% més baixos (3 ± 1 i 3 ± 1 mM, respectivament). A més, un mes després del tractament amb STZ, els ratolins control presentaven un increment de 3 vegades en el consum de menjar i de 5 vegades en el consum d'aigua (Figura 18), la qual cosa indicava la severitat de la diabetis. En canvi, el consum de menjar i d'aigua només va incrementar 1.5 i 1.7 vegades respectivament en ratolins tractats amb STZ que havien rebut els miotubs C₂C₁₂GK (Figura 18). La pèrdua de pes corporal també era menor en aquests ratolins (una disminució del 7%, de 31 ± 2 a 29 ± 1 g) que en els ratolins no trasplantats (disminució del 20%, de 30 ± 2 a 24 ± 1 g) i que en els ratolins receptors de miotubs C₂C₁₂ (descens del 18%, de 29 ± 2 a 24 ± 2 g). Per tant,

aquests resultats suggerien que el trasplantament de miotubs C₂C₁₂GK en ratolins singènics tractats amb STZ permetia una contrarestació de la hiperglucèmia diabètica i una millora dels paràmetres indicatius de severitat en diabetis.

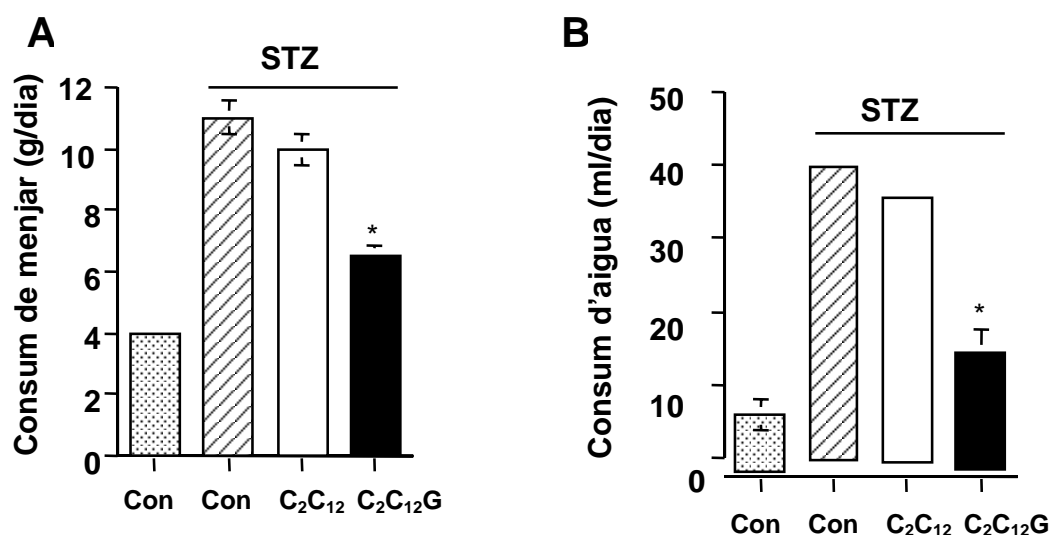


Figura 18. Disminució de la polifàgia i la polidípsia en ratolins trasplantats amb cèl·lules C₂C₁₂GK diferenciades. (A) Consum de menjar i (B) consum d'aigua 1 mes després del tractament amb STZ. Els resultats representen les mitges ±SEM de 8 animals per grup. (*p < 0.05 vs. C₂C₁₂).

Dos mesos després del trasplantament cel·lular, els ratolins tractats amb STZ van ser sacrificats i es va determinar el contingut de glucogen hepàtic. Es va observar que els ratolins trasplantats amb miotubs C₂C₁₂GK presentaven un increment en el contingut de glucogen hepàtic, mentre que els ratolins trasplantats amb miotubs C₂C₁₂ mostraven uns nivells de glucogen inferiors (Figura 19A). Així, la concentració de glucogen hepàtic dels ratolins trasplantats amb miotubs C₂C₁₂GK i tractats amb STZ era similar a la concentració detectada en el fetge de ratolins controls sans (Figura 19A). Aquesta observació es va confirmar mitjançant tinció àcid periòdic-Schiff (PAS) de seccions de fetge (fig 19B i C). Per tant, la reducció de la hiperglucèmia anava associada a un increment en el contingut de glucogen hepàtic de ratolins trasplantats amb miotubs C₂C₁₂GK tractats amb STZ. Aquests resultats suggerien que el lactat produït després de la metabolització de glucosa en els miotubs C₂C₁₂GK era convertit en glucogen al fetge mitjançant la via indirecta de síntesi del glucogen.

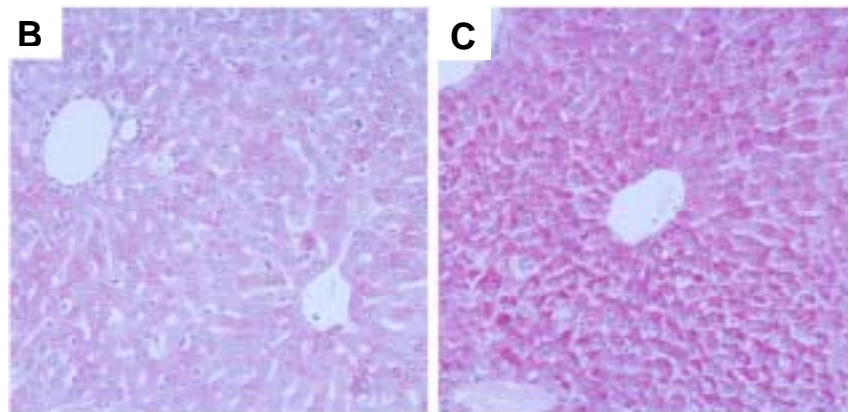
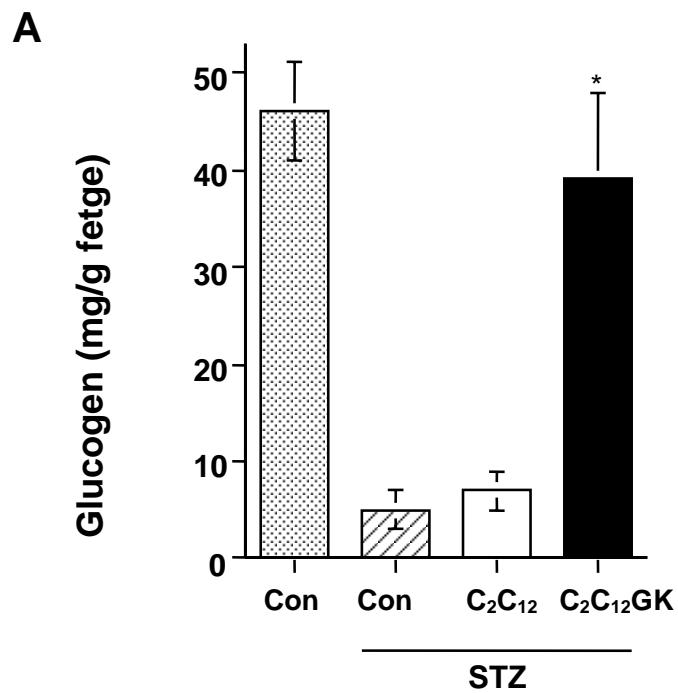


Figura 19. Contingut hepàtic de glucogen. (A) Es va determinar el contingut hepàtic de glucogen en extractes obtinguts del fetge de ratolins alimentats tractats amb STZ no trasplantats (Con-STZ), trasplantats amb C₂C₁₂, o trasplantats amb C₂C₁₂GK, i del fetge de ratolins sans (Con), tal com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats són les mitges \pm SEM de 5 ratolins en cada grup. (B i C) Seccions representatives de fetge tenyides per mostrar el contingut de glucogen (PAS) en (B) ratolins trasplantats amb C₂C₁₂ o (C) ratolins trasplantats amb C₂C₁₂GK (x200 augments).

Els ratolins tractats amb STZ van ser sacrificats dos mesos després del trasplantament cel.lular, i es van agafar com a mostres els implants cel.lulars. Aquests implants es van sotmetre a anàlisi histològica mitjançant tinció amb hematoxilina/eosina. Així, es va observar que tant els miotubs C_2C_{12} com els miotubs $C_2C_{12}GK$ formaven estructures adherides al peritoneu similars al múscul esquelètic (Figura 20). Els implants presentaven les estriacions transversals i els múltiples nuclis perifèrics característics de les fibres musculars esquelètiques diferenciades (Figura 20). També, es va observar la presència de vasos sanguinis en l'implant, com ve demostrat a la figura per la presència de glòbuls vermells. A més, tots els implants obtinguts dels ratolins injectats amb miotubs $C_2C_{12}GK$ mantenien l'expressió del gen de la GK (Figura 21). No es va detectar expressió en els implants extrets dels ratolins injectats amb miotubs control C_2C_{12} (Figura 21). A més, no es van trobar tumors a l'abdomen dels ratolins trasplantats amb miotubs.

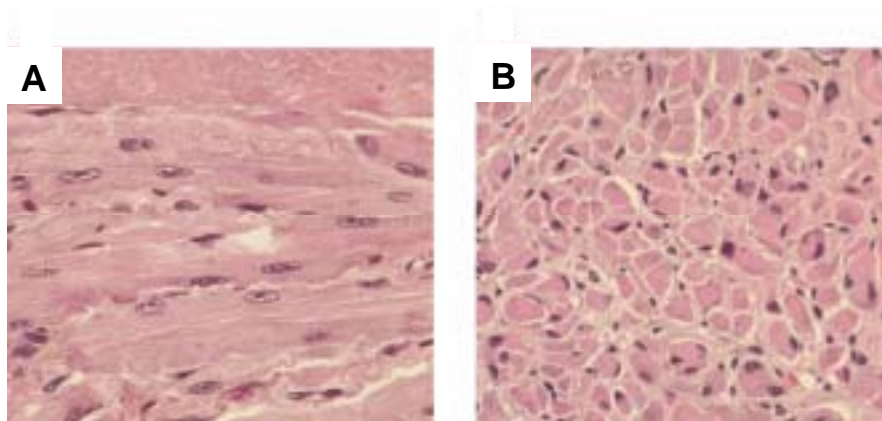


Figura 20. Anàlisi histològica dels implants al peritoneu de la paret abdominal. Vuit setmanes després del trasplantament, es van extreure els implants i van ser tenyits amb hematoxilina/eosina. **(A)** Secció longitudinal (augment original, x400). **(B)** Secció transversal (augment original, x200).

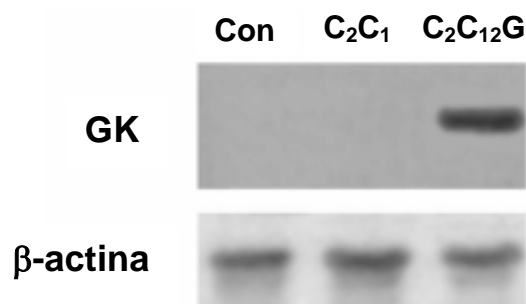


Figura 21. Expressió del gen quimèric MLC/GK als implants intraperitoneals. Es va aïllar RNA total dels implants extrets a les 8 setmanes del trasplantament amb miotubs C₂C₁₂ o C₂C₁₂GK, i es va analitzar per Northern blot. Les membranes es van hibridar amb sondes corresponents a la GK o a la β-actina. Es mostra un Northern blot representatiu.

2.3.2. Reversió de la hiperglucèmia diabètica després del trasplantament de miotubs C₂C₁₂GK.

També es va voler estudiar la capacitat dels miotubs que expressaven GK per revertir la hiperglucèmia diabètica un cop establerta. Per fer això es van tractar ratolins C3H amb STZ i quan els nivells de glucosa sanguínia excedien els 550 mg/dl, es van trasplantar miotubs C₂C₁₂ o miotubs C₂C₁₂GK a la seva cavitat peritoneal. Els ratolins injectats amb miotubs C₂C₁₂ van continuar essent altament hiperglucèmics (Figura 22). En canvi, en els ratolins trasplantats amb miotubs C₂C₁₂GK els nivells de glucosa sanguínia van disminuir i es van mantenir al voltant de 241±80 mg/dl fins el final de l'estudi (Figura 22). En aquell punt, la glucèmia en ratolins diabètics trasplantats amb miotubs C₂C₁₂GK era només 1.6 vegades més gran que la de ratolins no tractats amb STZ, mentre que en ratolins tractats amb STZ i injectats amb miotubs C₂C₁₂ la glucèmia era més de 4.5 vegades més elevada (Figura 22). A més, no es va detectar l'aparició d'hipoglucèmia en els ratolins trasplantats amb miotubs C₂C₁₂GK.

Sis setmanes després del tractament amb STZ es va determinar la glucèmia en ratolins dejunats durant la nit. Es va observar que els ratolins tractats amb STZ i trasplantats amb miotubs C₂C₁₂GK mostraven nivells de glucosa sanguínia similars als de ratolins control no tractats amb STZ, mentre que els ratolins tractats amb STZ i trasplantats amb miotubs

C₂C₁₂ es mantenien altament hiperglucèmics (ratolins no tractats amb STZ, 81±6 mg/dl; ratolins tractats amb STZ i no trasplantats, 139±20 mg/dl; ratolins tractats amb STZ i trasplantats amb miotubs C₂C₁₂, 139±16 mg/dl; i ratolins tractats amb STZ i trasplantats amb miotubs C₂C₁₂GK, 87±6 mg/dl). Aquests resultats suggerien que els miotubs C₂C₁₂GK incrementaven el consum de glucosa i permetien una reversió de la hiperglucèmia en ratolins diabètics.

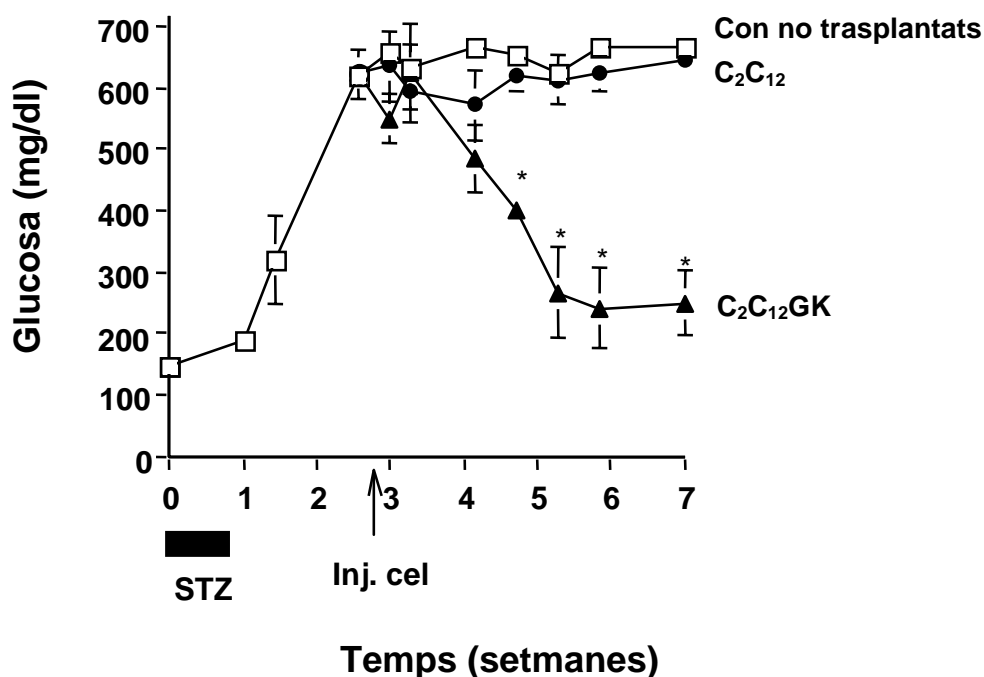


Figura 22. Efecte del trasplantament de miotubs C₂C₁₂GK a la cavitat peritoneal de ratolins diabètics. Es va induir la diabetis en ratolins C3H, tal com s'indica a Materials i Mètodes. Dinou dies després del tractament amb STZ els ratolins van ser trasplantats amb miotubs C₂C₁₂ (●) o C₂C₁₂GK (▲) i es va fer un seguiment de la glucèmia. També es va mesurar la glucèmia de ratolins C3H diabètics no trasplantats (□). Els resultats representen les mitges ±SEM de 10 ratolins a cada grup (*p<0.05 vs. C₂C₁₂).

Així doncs, en aquest estudi, donat que GK era clau *in vivo* en els estudis amb ratolins transgènics, es va dur a terme una teràpia *ex vivo* amb GK per tal d'incrementar la captació de glucosa fent servir cèl·lules musculars manipulades per expressar l'enzim. Així, hem mostrat que els mioblasts C₂C₁₂ podien ser manipulats per tal d'expressar GK sota el control del promotor MLC. La transfecció estable permet la selecció de clons amb elevats nivells d'expressió i que aquesta expressió del gen quimèric es produeixi a llarg

termini. Es va observar que els miotubs C₂C₁₂GK expressaven GK a partir del primer dia de diferenciació i continuaven expressant l'enzim fins el final de l'estudi (dos mesos després del transplantament). Degut a l'elevada activitat GK en els miotubs C₂C₁₂GK, aquests consumien glucosa, produïen lactat i sintetitzaven glucogen de forma més eficient que els miotubs C₂C₁₂. A més, la inducció de la captació de glucosa per GK era glucosa dependent. S'havien descrit resultats similars *in vitro* en cèl.lules d'hepatoma (Valera, 1994) i cèl.lules musculars humanes (Baqué, 1998) manipulades per expressar GK, així com en hepatocits de ratolins transgènics que sobreexpressen GK (Ferre, 1996a,b).

Per tant, les cèl.lules C₂C₁₂GK un cop diferenciades a miotubs expressaven i sintetitzaven GK biològicament activa, i presentaven un increment en la capacitat d'eliminar glucosa del medi de forma dependent de la concentració de glucosa present. Això és consistent amb l'elevada K_m de la glucoquinasa, les seves propietats de cooperativitat cinètica amb el sucre i la manca d'inhibició per glucosa-6-fosfat (Iynedjian, 1993; Printz, 1993). A més, també es va observar un increment en l'expressió del transportador GLUT1 en miotubs C₂C₁₂GK. Això podria assegurar l'increment necessari en el flux de glucosa per tal de mantenir l'augment en el metabolisme del sucre causat per l'activitat GK en aquestes cèl.lules. S'havien descrit observacions similars a aquesta sobreregulació en l'expressió de GLUT1 en el cas de cèl.lules que presenten una glucòlisi incrementada o en cèl.lules amb captació de glucosa augmentada *in vivo* en comparació amb teixits normals (Holm, 1995; Chen, 2001). A més, això estaria d'acord amb el fet que la sobreexpressió de GLUT1 en múscul esquelètic de ratolins transgènics porta a un increment en el transport de glucosa (Ren, 1993).

El trasplantament de miotubs C₂C₁₂GK en ratolins singènics C3H prevenia eficientment l'aparició de la hiperglucèmia quan es realitzava un tractament amb STZ. Això suggeria que el descens en els nivells de glucosa sanguínia podria ser degut a un increment en la metabolització de la glucosa per part dels miotubs C₂C₁₂GK, confirmant la seva capacitat de captar el sucre *in vivo*. No obstant, el trasplantament d'aquestes cèl.lules en animals receptors sans resultava en un manteniment de la normoglucèmia, sense l'aparició d'episodis d'hipoglucèmia. Donat que l'expressió de GK en miotubs C₂C₁₂GK és constitutiva, aquestes observacions indicaven una regulació a curt termini de l'activitat GK mitjançant la seva cooperativitat amb glucosa (Iynedjian, 1993; Printz, 1993) i, per tant, una regulació de la captació de glucosa. Aquesta regulació permetria, en primer lloc,

reduir la hiperglucèmia mitjançant un increment en la captació de glucosa quan la glucèmia és elevada i, en segon lloc, evitar l'hipoglucèmia reduint la captació del sucre en situació de normoglucèmia.

Per altra banda, l'increment en la producció de lactat observat *in vitro* en els miotubs C₂C₁₂GK no portava a un augment del lactat sanguini després del trasplantament en ratolins sans. Això podria ser degut a la metabolització del lactat pel fetge d'aquests animals. A més, el trasplantament de miotubs C₂C₁₂GK protegia els ratolins de l'aparició d'hiperglucèmia induïda per tractament amb STZ, i això es traduïa en un manteniment del pes corporal dels animals i una disminució en la polifàgia i la polidípsia característiques de la malaltia. Aquesta reducció de la hiperglucèmia anava lligada a un increment en el contingut de glucogen hepàtic dels ratolins trasplantats amb miotubs C₂C₁₂GK. Probablement, el lactat produït per la metabolització de la glucosa als miotubs C₂C₁₂GK es metabolitzava a glucogen al fetge mitjançant la seva via indirecta de síntesi (glucosa → lactat → glucosa-6-fosfat → glucogen). En la diabetis es produeix una alteració de la fosforilació hepàtica de la glucosa degut a la manca d'insulina i, en conseqüència, es dona un bloqueig en la via directa de síntesi de glucogen (glucosa → glucosa-6-fosfat → glucogen). Aquest increment en la via indirecta seria similar a l'observat en fetge durant la transició de dejú a alimentació (Newgard, 1983, 1984a).

A més, no es van detectar tumors en els animals receptors dels miotubs, la qual cosa confirmava que la disminució en els nivells de glucosa sanguínia era deguda a un increment en la captació i metabolització del sucre per les cèl.lules C₂C₁₂GK. D'altra banda, el trasplantament de miotubs C₂C₁₂GK també revertia eficientment la hiperglucèmia de ratolins diabètics, confirmant de nou la seva capacitat per captar glucosa *in vivo*. Cap d'aquests altres receptors va esdevenir hipoglucèmic. Per tant, aquests resultats indicaven que l'ús de cèl.lules musculars encapsulades que expressin GK podria ser una forma segura d'incrementar la captació de glucosa *in vivo*.

Així doncs, aquesta estratègia podria resultar una aproximació de teràpia gènica *ex vivo* en la qual la cooperativitat cinètica de la GK amb la glucosa seria aprofitada per aconseguir una regulació a curt termini dependent de la concentració sanguínia del sucre. Així, la GK podria ser considerada com un sensor de glucosa que incrementa la captació del sucre en resposta a la hiperglucèmia. Per tant, els miotubs C₂C₁₂GK podrien ser útils

en el tractament de la diabetis mellitus de tipus 1, per eliminar l'excés de glucosa sanguínia. A més, s'ha descrit que l'expressió de GK en múscul esquelètic de ratolins transgènics juntament amb l'administració de baixes dosis d'insulina soluble porta a la normalització de la glucèmia (Otaegui, 2000). Aleshores, aquestes observacions suggereixen que l'ús de miotubs manipulats per expressar GK podria permetre reduir les dosis d'insulina administrades per mantenir la normoglicèmia. Una aproximació d'aquest tipus permetria prevenir la hiperglicèmia crònica i evitar l'aparició d'episodis d'hipoglicèmia en pacients sotmesos a teràpia convencional amb insulina.

Per tant, en aquesta primera part del treball experimental, hem demostrat l'efecte de l'expressió de GK en el múscul esquelètic per contrarestar la hiperglicèmia en la diabetis de tipus 1. Així, s'han dut a terme dues aproximacions diferents per tal d'estudiar la capacitat d'aquest enzim de disminuir la hiperglicèmia diabètica. D'una banda, s'ha investigat si es podia millorar l'efecte de l'expressió de GK en animals transgènics mitjançant un increment d'ambdós, el transport i la fosforilació de la glucosa. D'altra banda, hem realitzat un estudi *ex vivo* en el qual s'han trasplantat a ratolins diabètics cèl.lules musculars que expressen GK. Els dos subapartats indiquen que l'expressió de GK en múscul esquelètic podria ser útil per tal d'aconseguir una disminució en la hiperglicèmia diabètica. No obstant, caldria combinarla amb una teràpia amb baixes dosis d'insulina exògena per aconseguir un control adequat de la normoglicèmia.

PART II:

**EXPRESSIÓ DE LA GLUCOQUINASA AL
MÚSCUL ESQUELÈTIC:
CONTRARESTACIÓ DE LA DIABETIS DE
TIPUS 2**

Donada la millora en la hiperglucèmia obtinguda amb l'expressió de GK en múscul esquelètic en models de diabetis de tipus 1, ens vam plantejar estudiar l'efecte de l'expressió de l'enzim hepàtic en aquest teixit per tal de contrarestar la diabetis de tipus 2. El múscul esquelètic és el principal teixit implicat en l'eliminació de glucosa després d'una ingesta. S'ha descrit que defectes primaris en la captació i utilització de la glucosa pel múscul esquelètic condueixen a defectes secundaris en l'acció de la insulina al fetge i al teixit adipós, la qual cosa contribueix a un increment en la resistència a l'hormona i a un augment en la producció hepàtica del sucre (Kim et al., 2001). Per tant, el múscul esquelètic és un dels principals llocs on es produeix la resistència a la insulina pròpia de la diabetis de tipus 2. Aquesta resistència, caracteritzada per una disminució en la captació i utilització de glucosa en resposta a concentracions normals d'insulina, pot ser deguda a defectes en el transport de glucosa, la fosforilació de glucosa o la síntesi de glucogen. Hi ha evidències que suggereixen que la fosforilació de la glucosa té un paper clau en la utilització del sucre pel múscul esquelètic. Per tant, tot i que tant el transport com la fosforilació de la glucosa presenten resistència a l'acció de la insulina, es creu que la disminució en la fosforilació del sucre és probablement el pas limitant en l'acció de l'hormona (Bonadonna et al., 1996). Així, ens vam plantejar incrementar la fosforilació de la glucosa en múscul esquelètic de models de diabetis tipus 2 mitjançant l'expressió de l'enzim GK. Amb això es pretenia aconseguir un increment en la captació i utilització del sucre i, per tant, una millora en la resistència a la insulina en aquest teixit.

Les causes implicades en el desenvolupament de diabetis de tipus 2 encara són desconegudes. Existeixen evidències que suggereixen una interrelació complexa entre un o més locus genètics i diversos factors ambientals (en particular la dieta i l'activitat física). Entre els factors ambientals, l'elevat contingut en greixos de les dietes occidentals típiques es considera la causa principal de la resistència a la insulina associada a obesitat. A més, s'ha descrit que, entre els gens candidats que intervenen en el desenvolupament de la resistència a la insulina, es troben els gens que codifiquen per a molècules de la via de senyalització de l'hormona (Kahn, 1994; O'Rahilly, 1995). S'han realitzat seleccions *in vivo* de diversos components de la via de senyalització de la insulina per tal de clarificar els mecanismes moleculars que intervenen en el desenvolupament de la malaltia. Així, s'han obtingut ratolins genosuprimits en el receptor de la insulina (Accili, 1996), en el receptor d'IGF-1 (Accili, 1999), en IRS-1 (Araki, 1994; Tamemoto, 1994), en IRS-2 (Withers, 1998; Kubota, 2000), en GLUT4 (Katz, 1995), PTP1B (Elchebly, 1999), etc.

Un d'aquests models animals són els ratolins amb una disrupció del locus de l'IRS-1. Els ratolins IRS-1^{-/-} s'han utilitzat com a model d'estudi perquè presenten una resistència als efectes hipogluceiants de la insulina i l'IGF-1 i mostren una tolerància a la glucosa lleugerament alterada, però no presenten diabetis, probablement degut a una hiperinsulinèmia compensatòria causada per una hiperplàsia selectiva de les cèl·lules beta. No obstant, tot i que la massa de cèl·lula beta es troba incrementada en ratolins genosuprimits en IRS-1, els illots d'aquests animals presenten defectes en el contingut d'insulina i en la seva secreció en resposta a glucosa. En canvi, els animals heterozigots per la deficiència en IRS-1 aparentment no presenten fenotip clínic.

En el nostre laboratori ens vam plantejar la hipòtesi que animals IRS-1^{+/-} alimentats amb una dieta alta en lípids podrien presentar una elevada susceptibilitat a desenvolupar resistència a la insulina i hiperinsulinèmia quan es comparessin amb animals controls alimentats amb la mateixa dieta. Per tant, vam decidir estudiar si es podria utilitzar com a model de diabetis tipus 2 els ratolins IRS-1^{+/-} alimentats amb dieta alta en lípids. D'aquesta manera podríem reproduir la interrelació entre les alteracions genètiques i els factors ambientals que, quan es donen conjuntament, resulten en el desenvolupament de resistència a la insulina. Així, un primer objectiu d'aquesta part de l'estudi va ser la caracterització dels animals IRS-1^{+/-} en dieta alta en lípids com a model de resistència a la insulina.

En segon lloc, es va determinar si l'expressió de GK en múscul esquelètic permetia contrarestar la resistència a la insulina en aquest model de diabetis de tipus 2. Amb aquesta finalitat, es van generar ratolins IRS-1^{+/-} que expressaven GK en múscul esquelètic mitjançant creuament dels animals parcialment genosuprimits amb ratolins transgènics MLC/GK. Posteriorment es van estudiar els efectes diabetogènics d'una dieta alta en lípids sobre aquests animals.

D'altra banda, en una tercera part de l'estudi vam analitzar si en ratolins genosuprimits IRS-1^{-/-} homozigots, que presentaven resistència a la insulina però no eren obesos, es podria incrementar la sensibilitat a l'hormona mitjançant l'expressió de GK en múscul esquelètic. Amb aquesta finalitat es va electrotransferir *in vivo* el gen de la GK a múscul esquelètic de ratolins IRS-1^{-/-}, i a continuació es van estudiar els efectes de l'expressió de l'enzim en aquest model animal de resistència a la insulina.

1. CARACTERITZACIÓ D'UN MODEL ANIMAL DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA: RATOLINS IRS-1^{+/-} ALIMENTATS AMB UNA DIETA ALTA EN LÍPIDS.

En aquesta primera part de l'estudi, animals controls i IRS-1^{+/-} es van alimentar amb una dieta d'alt contingut en lípids i es va estudiar el desenvolupament de resistència a la insulina en els dos grups d'animals.

1.1. INDUCCIÓ DE L'ESTAT DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA EN RATOLINS IRS-1^{+/-} MITJANÇANT ALIMENTACIÓ AMB DIETA ALTA EN LÍPIDS.

Els animals IRS-1^{+/-} van ser obtinguts a partir de ratolins IRS-1^{-/-} i IRS-1^{+/-} cedits pel laboratori del Dr. Ronald Kahn (Joslin Diabetes Center, and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA). Es van encreuar animals IRS-1^{-/-} amb animals IRS-1^{+/-} i la F1 obtinguda es va torna a encreuar entre sí per tal d'obtenir animals controls, IRS-1^{+/-} i IRS-1^{-/-}. Aquests ratolins van ser genotipats mitjançant anàlisi per Southern blot (dades no mostrades) i es van seleccionar els animals controls i IRS-1^{+/-} per continuar l'estudi.

S'ha descrit que una dieta amb un 42% de contingut en greix, indueix resistència a la insulina i aparició de diabetis tipus 2 (Uysal, 1997; Storlien, 1996). Per això es van sotmetre ratolins control i IRS-1^{+/-} a una dieta alta en lípids. Durant l'estudi es va fer un seguiment de l'increment de pes corporal, així com de l'evolució de la glucèmia i de la insulinèmia. A continuació, es va confirmar l'aparició de resistència a la insulina mitjançant un test de tolerància a l'hormona.

1.1.1. Evolució del pes corporal.

Ratolins controls i IRS-1^{+/-} van ser alimentats durant quatre mesos amb una dieta alta en lípids. Durant aquest període es va realitzar un seguiment de l'increment de pes d'aquests animals al llarg del temps. Es va observar que ambdós, els ratolins control i els ratolins IRS-1^{+/-} incrementaven el seu pes corporal en un 30% respecte el pes inicial abans de començar la dieta (Figura 1). Per altra banda, els animals controls i IRS-1^{+/-} alimentats

amb dieta estàndard únicament presentaven un increment del 5% en el seu pes corporal al final de l'experiment. Això indicava que la disminució del 50% dels nivells d'IRS-1 no tenia cap efecte addicional sobre l'increment de pes causat per l'alimentació amb dieta alta en lípids, ja que ambdós grups d'animals desenvolupaven un grau similar d'obesitat.

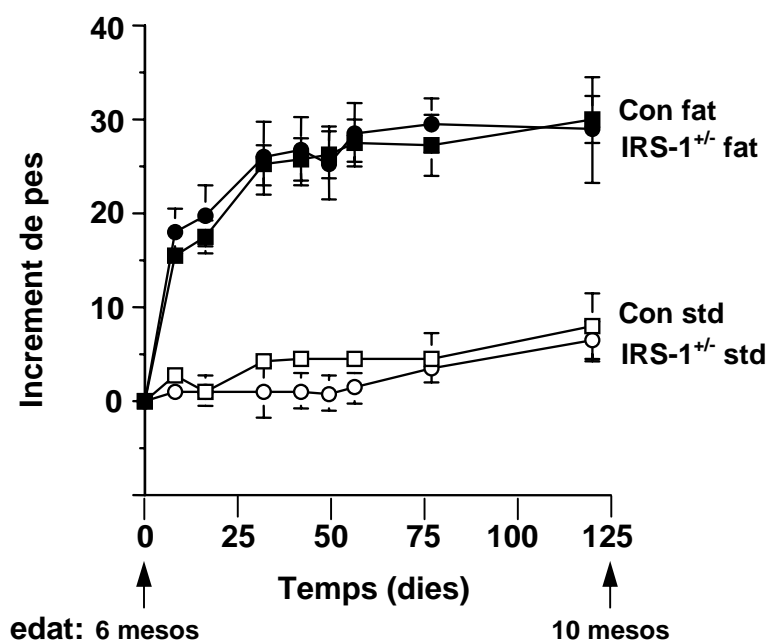


Figura 1. Evolució del pes corporal de ratolins controls (Con std, □) i IRS-1^{+/+} (IRS-1^{+/+}std,○) alimentats amb dieta estàndard i d'animals controls (Con fat, ■) i IRS-1^{+/+}(IRS-1^{+/+}fat, ●) de 6 mesos d'edat i alimentats durant quatre mesos amb una dieta alta en lípids. Els resultats són les mitges ± SEM.

1.1.2. Estudi de la glucèmia i de la insulinèmia.

Es va mesurar la glucèmia en alimentació i en dejú d'animals controls i animals IRS-1^{+/+} alimentats amb una dieta estàndard o bé amb una dieta alta en lípids durant 4 mesos. En estat d'alimentació no s'observaven diferències significatives en la glucèmia de cap dels dos grups sotmesos a dieta alta en lípids respecte els corresponents valors de glucèmia amb una dieta estàndard (Figura 2A). Tampoc s'apreciaven diferències significatives entre les glucèmies dels dos grups, controls i IRS-1^{+/+} (Figura 2A). D'altra banda, en estat de dejú, els ratolins d'ambdós genotips alimentats amb dieta alta en lípids presentaven un increment en la glucèmia respecte animals controls i IRS-1^{+/+} en dieta estàndard (Figura

2B). A més, ratolins IRS-1^{+/-} en dieta alta en lípids mostraven una lleugera hiperglucèmia quan es comparaven amb animals controls sotmesos a la mateixa dieta (Figura 2B).

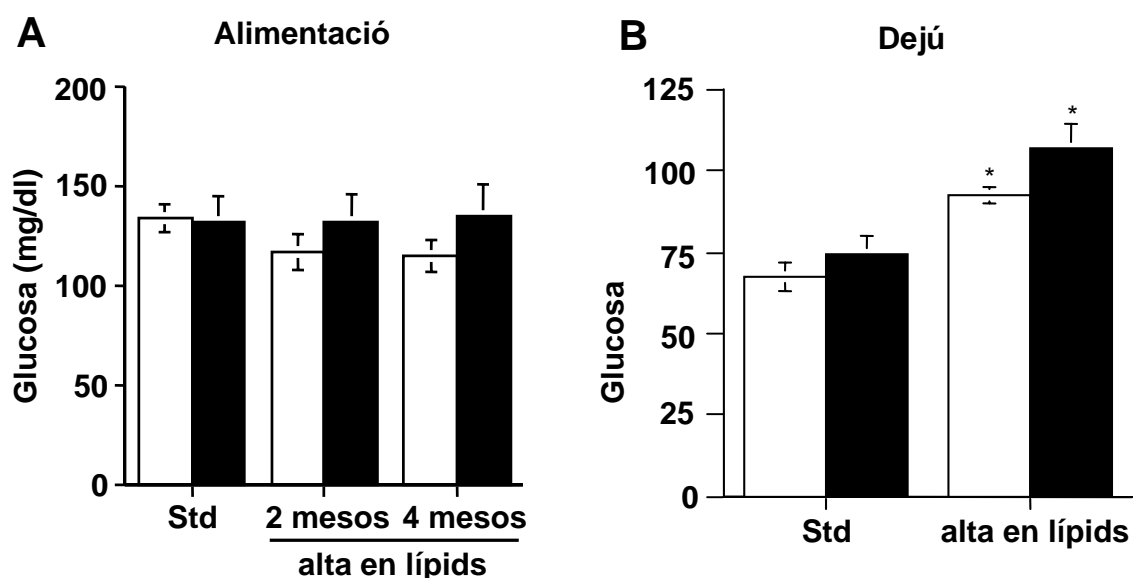


Figura 2. Anàlisi de la glucèmia en alimentació (A) o en dejú (B). Es va determinar la glucèmia en alimentació (A) o en dejú (B) d'animals controls (□, Con) i IRS-1^{+/-} (■, IRS-1^{+/-}) alimentats amb una dieta estàndard (Std) o bé sotmesos a una dieta alta en lípids (alta en lípids) durant 4 mesos. Es van obtenir mostres de sang a partir de la vena caudal i es va mesura la glucèmia tal com es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats s'expressen com les mitges ± SEM de 10 animals per grup. (*) p<0.05 vs std.

També es va determinar la insulinèmia d'animals controls i IRS-1^{+/-} als 2 i 4 mesos d'alimentació amb dieta alta en lípids. Es va observar que tant als 2 com als 4 mesos sotmesos a aquesta dieta, els ratolins IRS-1^{+/-} presentaven un increment en la insulinèmia respecte els animals controls (Figura 3). Així, als 2 mesos de dieta alta en lípids, els ratolins controls mostraven una insulinèmia incrementada aproximadament dues vegades respecte els valors en dieta estàndard, mentre que en els animals IRS-1^{+/-} l'augment era d'unes quatre vegades. A més, després de 4 mesos en dieta, els ratolins IRS-1^{+/-} encara presentaven un major increment en la insulinèmia, mentre que els controls mantenien nivells similars als observats als 2 mesos de dieta. Això suggeriria que la deficiència d'IRS-1 comportava una major susceptibilitat a desenvolupar hiperinsulinèmia en condicions d'alimentació amb dieta alta en lípids.

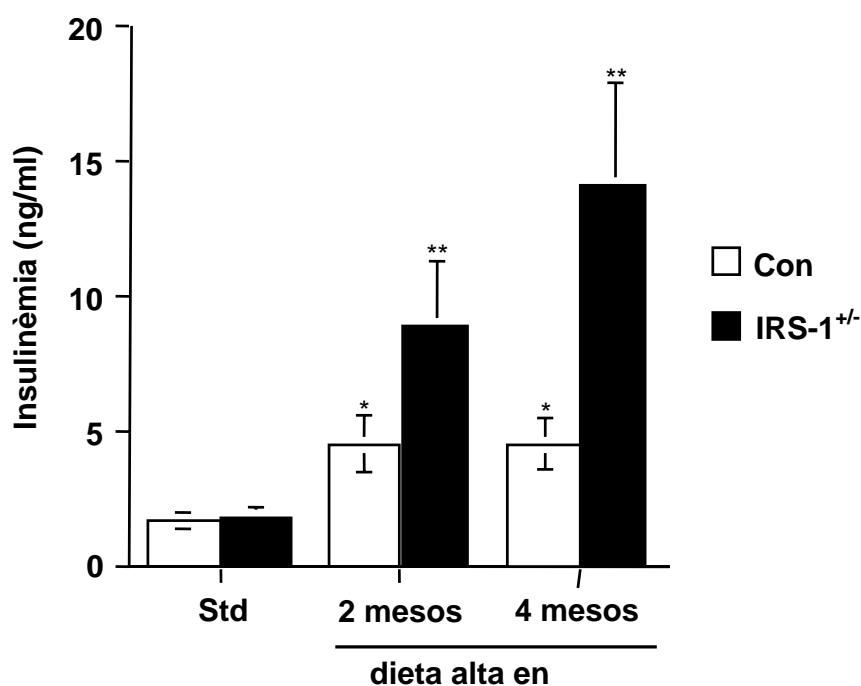


Figura 3. Anàlisi de la insulinèmia. Es va determinar la insulina sèrica en alimentació de ratolins controls (Con, □) i d'animals IRS-1^{+/-} (IRS-1^{+/-}, ■) alimentats amb dieta alta en lípids durant dos i quatre mesos. Els resultats s'expressen com la mitja ± SEM de 10 animals per grup. (*) p<0.05 vs Std. (**) p<0.05 vs Std i Con alta en lípids.

1.1.3. Test de tolerància a la insulina.

Per tal de determinar si la disminució en els nivells d'IRS-1^{+/-} en animals alimentats amb una dieta alta en lípids afavoria l'aparició de resistència a la insulina, es va realitzar un test de tolerància a l'hormona. Així, es va administrar als animals una dosi intraperitoneal de 0.75 UI d'insulina soluble per kg de pes. Es van obtenir mostres de sang a partir de la vena de la cua als temps indicats, i els valors obtinguts es van representar com a percentatge de glucosa respecte els nivells basals (Figura 4). Així, es va observar que en els ratolins IRS-1^{+/-} alimentats amb dieta alta en lípids la disminució de glucèmia al llarg del temps només assolía valors propers al 10% als 15 i 30 min de la injecció d'insulina. Per contra, els ratolins controls en dieta alta en lípids disminuïen la seva glucèmia gairebé

en un 30% als 30 minuts de l'administració de l'hormona. D'altra banda, els animals controls i IRS-1^{+/-} en dieta estàndar presentaven una disminució del 40% als 15 minuts. Aquesta disminució en al glucèmia era transitòria i els animals recuperaven els valors basals de forma gradual. Això indicava que la deficiència d'IRS-1 afavoria l'aparició de resistència a la insulina en dieta alta en lípids, ja que animals IRS-1^{+/-} amb una alimentació en alt contingut en greixos presentaven una gran insensibilitat als efectes de l'hormona. En canvi, no s'apreciava cap efecte de l'eliminació parcial d'aquest al·lel en condicions d'alimentació estàndard.

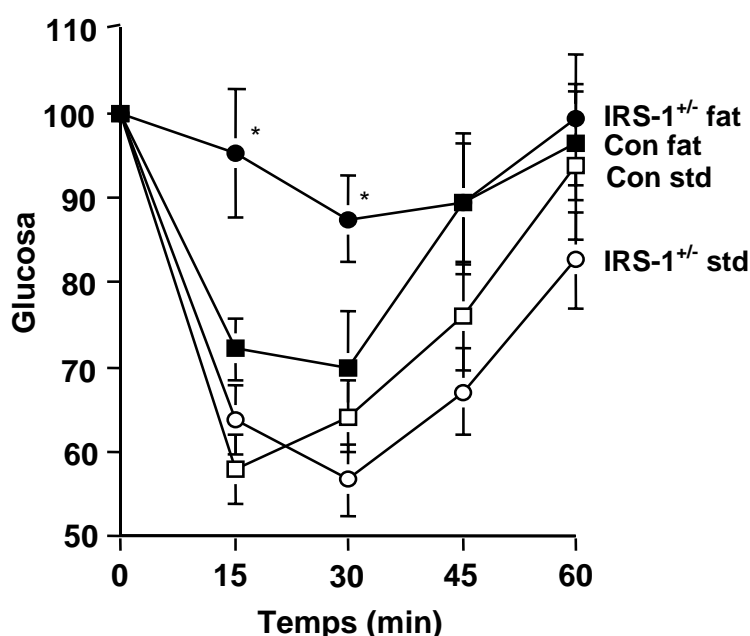


Figura 4. Test de tolerància a la insulina. Percentatge de disminució de la glucèmia respecte al temps. Es va injectar 0.75 U/Kg de pes d'insulina soluble a ratolins IRS-1^{+/-} (●) i controls (■) alimentats amb dieta alta en lípids i a ratolins IRS-1^{+/-} (○) i controls (□) alimentats amb dieta estàndard. Les mostres de sang es van prendre a partir de la vena caudal dels animals en els temps indicats, i es va determinar la glucèmia tal com es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats són les mitjanes \pm SEM de 7 animals a cada grup. (*) $p < 0.05$ vs Con fat.

1.1.4. Determinació de la leptina sèrica.

S'ha descrit que la concentració de leptina a la sang està incrementada en pacients obesos o diabètics de tipus 2 (Widjaja, 1997). Així, es van mesurar els nivells de leptina sèrica d'animals controls i IRS-1^{+/-} a l'inici i després de 2 o 4 mesos d'alimentació amb

dieta alta en lípids. Tant els ratolins controls com els animals IRS-1^{+/-} mostraven un increment en els nivells de leptina durant la dieta alta en lípids. Aquest augment de la leptina era més acusat en el cas dels ratolins IRS-1^{+/-} que en els controls, suggerint que la supressió d'un al.lel de l'IRS-1 provocava un major increment en la resistència a la insulina.

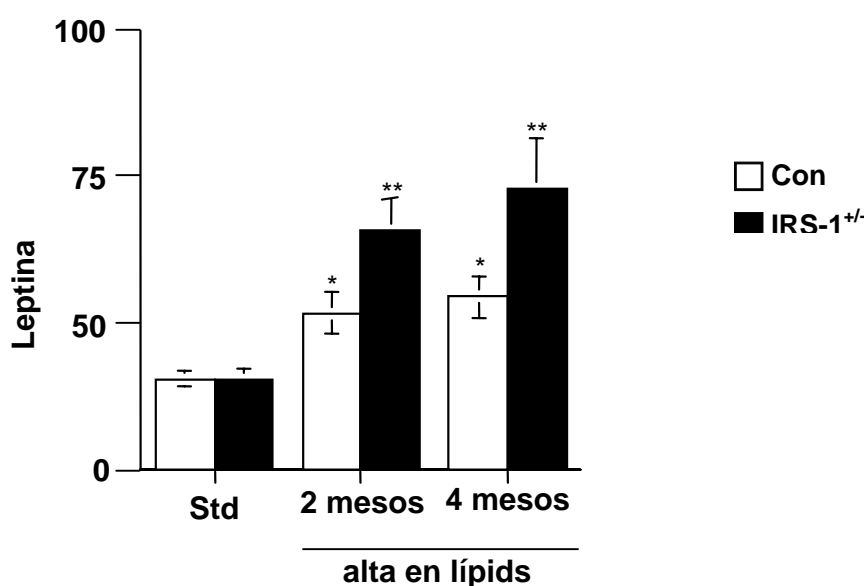


Figura 5. Nivells de leptina sèrica. Abans de l'inici (Std) i després de 2 i 4 mesos de dieta alta en lípids, es van mesurar les concentracions de leptina circulants en sèrum de ratolins controls (Con, n=10) i IRS-1^{+/-} (n=10). Els resultats s'expressen com la mitja \pm SEM. (*) $p < 0.05$ vs Std. (**) $p < 0.05$ vs Std i Con alta en lípids.

Així doncs, el primer objectiu d'aquest estudi va ser la caracterització d'un model animal de resistència a la insulina que mimetitzés al màxim les característiques de la patologia en humans. La diabetis de tipus 2 es desenvolupa com a resultat de la combinació d'una sèrie de factors genètics i ambientals. IRS-1 és un dels principals substrats del receptor de la insulina (Sun, 1991; Araki, 1993), i s'han detectat diversos polimorfismes en el gen que codifica per l'IRS-1 en pacients amb diabetis de tipus 2 (Almind, 1993; Ura, 1996). A més, els familiars directes de pacients diabètics de tipus 2, que, per tant, tenen una gran predisposició genètica a desenvolupar aquesta malaltia, sovint presenten alteracions

genètiques al gen de l'IRS-1 (Almind, 1993; Imai, 1994; Hitman, 1995; Porzio, 1999). D'altra banda, existeixen dades *in vitro* que indiquen que les alteracions en IRS-1 podrien contribuir a l'aparició de la resistència a la insulina (Almind, 1996). No obstant, tot i que la majoria dels polimorfismes d'IRS-1 es presenten en heterozigosi en la població humana, els animals IRS-1^{+/-} no presenten una alteració en l'homeòstasi de la glucosa ni en la sensibilitat a la insulina (Araki, 1994; Tamemoto, 1994). Per altra banda, està descrit que els factors ambientals com l'obesitat o les dietes altes en lípids es troben associats amb un increment en la prevalència de la diabetis de tipus 2 (King, 1993). També s'ha observat que els pacients obesos que presenten polimorfisme al gen de l'IRS-1 són més resistents a la insulina que aquells que no tenen la mutació, mentre que els portadors no obesos del polimorfisme tenen una sensibilitat a la insulina normal (Clausen, 1995). Aquestes dades suggereixen que l'efecte de la mutació en IRS-1 es desenvolupa quan interacciona amb altres factors, com per exemple la obesitat. Així doncs, en aquest estudi hem demostrat que la combinació de l'efecte de l'alteració genètica en IRS-1 amb un factor ambiental desencadenant, com seria una alimentació amb alt contingut en greixos, provoca el desenvolupament de la resistència a la insulina.

Així, ratolins IRS-1^{+/-} van ser alimentats amb una dieta d'elevat contingut en greixos. Tant en animals controls com en IRS-1^{+/-} es va produir un increment de pes similar respecte del pes inicial. Això semblava indicar que, molt probablement, la mutació en IRS-1 no potenciava l'aparició d'obesitat. D'altra banda, només s'observava un lleuger increment en la glucèmia en dejú dels animals IRS-1^{+/-} respecte dels controls. En canvi, sí que es va detectar un gran increment en la insulinèmia dels ratolins genosuprimits respecte dels controls, ambdós en dieta alta en lípids. S'ha descrit que l'alimentació amb aquest tipus de dieta provoca un augment dels nivells d'insulina sanguínia (Uysal, 1997), com es pot observar en els ratolins controls en dieta alta en lípids respecte l'alimentació estàndard. En el nostre estudi, els animals IRS-1^{+/-} mostraven una potenciació d'aquest increment respecte els ratolins controls en dieta alta en lípids, molt probablement degut a l'efecte de l'alteració genètica en IRS-1. L'alimentació amb dieta alta en lípids també provoca l'aparició de resistència a la insulina (Uysal, 1997). Així, els animals IRS-1^{+/-} en dieta alta en lípids presenten una alteració en la sensibilitat a l'hormona molt més marcada que l'observada en ratolins controls amb la mateixa alimentació. La resistència a la insulina característica de l'obesitat i de la diabetis de tipus 2 pot estar associada a alteracions a diversos nivells, com per exemple la quantitat de receptor de la insulina i la seva activitat

tirosina quinasa, la quantitat d'IRS-1 i d'IRS-2 i els seus nivells de fosforilació, l'activitat PI-3-quinasa, la translocació dels transportadors de glucosa o l'activitat d'enzims intracel·lulars (Pessin, 2000). En el nostre cas, la genosupressió heterozigota en IRS-1 molt probablement és un factor genètic que agreujaria l'efecte de la dieta alta en lípids sobre aquests mecanismes efectors que intervenen en la sensibilitat a l'acció de l'hormona. Aquesta sinèrgia entre l'alteració genètica, que porta associada una disminució en la senyalització de la insulina, i la dieta alta en lípids, en la qual també es dona una alteració d'aquesta senyalització, és similar al que s'observa en altres casos. Així, s'han descrit models genosuprimits combinats amb dobles delecions heterozigotes en, per exemple, el receptor de la insulina i l'IRS-1 (Bruning, 1997), IRS-1 i GK (Terauchi, 1997) i fins i tot la triple delecio heterozigota en el receptor de la insulina, IRS-1 i IRS-2 (Kido, 2000). En alguns d'aquests models combinats s'ha observat una evidència molt clara de l'epistàsia genètica respecte el desenvolupament de la malaltia. Així, la doble genosupressió $IR^{+/-} + IRS-1^{+/-}$ produeix resistència a la insulina, hiperinsulinèmia i hiperplàsia dels illots pancreàtics amb progressió cap a diabetes oberta en un 50% dels animals (Bruning, 1997). Tanmateix, s'ha observat un efecte del fons genètic sobre aquest fenotip, donat que la mateixa doble genosupressió en tres soques diferents de ratolí produeix una gran variabilitat en la hiperinsulinèmia, la tolerància a la glucosa i la hiperplàsia dels illots que mostren aquests animals (Kulkarni, 2003). Això suggereix que cada soca pot tenir diferents al·lels modificadors que incrementen o disminueixen la severitat del fenotip produït per la doble genosupressió.

D'altra banda, el teixit adipós, que es veu incrementat per aquest tipus d'alimentació, juga un paper molt important en la resistència a l'hormona. Es creu que els àcids greixosos circulants que deriven dels adipòcits podrien contribuir a la resistència a la insulina de la diabetes i de l'obesitat mitjançant una inhibició en la captació de glucosa, la síntesi de glucogen i l'oxidació de glucosa, i per un increment en la producció i sortida de glucosa hepàtica (Bergman, 2000). Els nivells elevats d'àcids greixosos lliures també estan associats amb una reducció en la fosforilació d'IRS-1 estimulada per insulina (Shulman, 2000). Per tant, en el nostre model, aquesta alteració podria estar agreujada pel fet que la genosupressió fa disminuir els nivells d'aquest intermediari i, en conseqüència, la quantitat de substrat susceptible de fosforil·lar-se. A més, apart de la seva funció com a reserva de lípids, el teixit adipós produeix i secreta diverses hormones, anomenades adipoquines, que poden influir sobre el metabolisme i la despesa energètica. Una

d'aquestes hormones és la leptina, que actua sobre el sistema nerviós central, inhibint la ingesta, i també sobre altres teixits perifèrics. En els nostre estudi hem observat un increment dels nivells de leptina, tant en animals controls com en IRS-1^{+/-} alimentats amb dieta alta en lípids. Això podria ser, per una banda, degut a un increment en el teixit adipós dels animals i, conseqüentment, en un increment en la producció de leptina. D'altra banda, aquest augment de la leptina era més elevat en els ratolins IRS-1^{+/-} que en els controls. La leptina incrementa la captació de glucosa en múscul esquelètic (Yaspelkis, 1999 i 2000). Per tant, és possible que la forta resistència a la insulina en els ratolins IRS-1^{+/-} tingui com a resposta una hiperproducció de leptina com a mecanisme per intentar compensar l'alteració en la captació del sucre. A més, cal tenir en compte que l'alteració en els nivells d'IRS-1 es dona també en teixit adipós, ja que el model animal presenta una genosupressió de la proteïna en tots els teixits (Araki, 1994; Tamemoto, 1994). Per tant, una alteració de la senyalització de la insulina al teixit adipós també podria estar involucrada en l'increment de leptina detectat en els animals IRS-1^{+/-} en dieta alta en lípids.

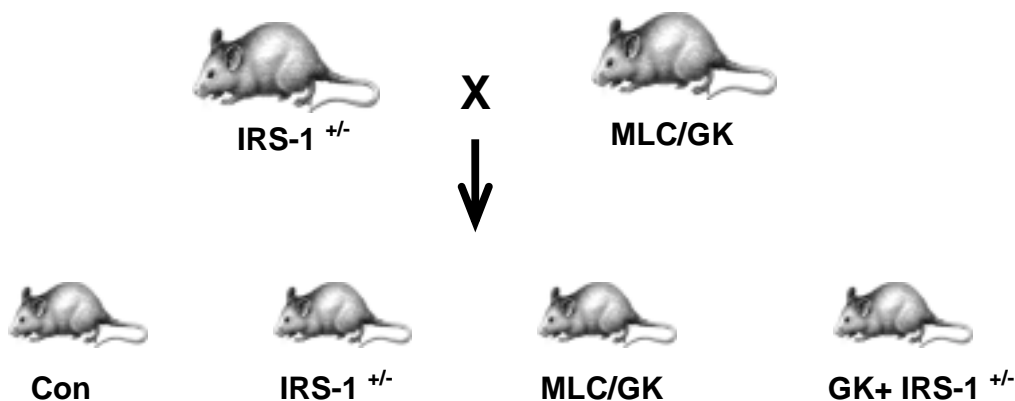
Tots aquests resultats suggerien que la disminució en els nivells d'IRS-1 accentuava els efectes diabetogènics d'una dieta alta en lípids, agreujant la resistència a la insulina i la hiperinsulinèmia característiques. Per tant, els animals IRS-1^{+/-} alimentats amb una dieta alta en lípids podrien ser un bon model animal de resistència a la insulina, en el qual es podrien provar noves aproximacions terapèutiques per tal de contrarestar la diabetis de tipus 2. De manera similar als nostres resultats, s'ha descrit que ratolins IRS-1^{+/-} tractats amb "gold thioglucosa" (una droga que actua sobre l'hipotàlem provocant hiperfàgia), a fi d'induir obesitat, presenten una disminució en la sensibilitat a la insulina, una alteració de la captació de glucosa sanguínia, i una alteració en la via de transducció de senyal de l'hormona (Shirakami, 2002). Aquestes observacions indiquen que l'efecte de la genosupressió parcial del gen de l'IRS-1 sobre l'homeòstasi de la glucosa i la sensibilitat a la insulina només es manifesta després de la inducció d'obesitat. Així, la combinació d'un defecte en la cascada de senyalització de la insulina amb una alimentació d'elevat contingut en greixos dona lloc a l'aparició de resistència a la insulina i a la progressió cap al fenotip diabètic. Donat això, aquests animals representen una eina molt útil per tal d'estudiar l'aplicació de noves teràpies per a la malaltia. Així doncs, varem decidir utilitzar els ratolins IRS-1^{+/-} alimentats amb una dieta alta en lípids com a model animal per estudiar l'efecte de la GK en la contrarestració de la resistència a la insulina.

2. EXPRESSIÓ DE LA GK EN MÚSCUL ESQUELÈTIC DE RATOLINS IRS-1^{+/-}.

Per tal d'estudiar l'efecte de la GK en la contrarestar de la resistència a la insulina, en primer lloc, es van generar ratolins IRS-1^{+/-} que expressaven GK en múscul esquelètic mitjançant creuament dels animals genosuprimits amb ratolins transgènics MLC/GK. En segon lloc, es van alimentar animals controls, transgènics MLC/GK, ratolins IRS-1^{+/-}, i ratolins GK+ IRS-1^{+/-}, amb una dieta d'alt contingut en lípids i es va estudiar el desenvolupament de resistència a la insulina en els quatre grups d'animals.

2.1. OBTENCIÓ DE RATOLINS IRS-1^{+/-} QUE EXPRESSEN GK EN MÚSCUL ESQUELÈTIC.

El primer pas va consistir en l'obtenció de ratolins IRS-1^{+/-} que expressessin GK en múscul esquelètic. Per això es van encreuar ratolins IRS-1^{+/-} amb animals transgènics MLC/GK, obtenint-se els quatre genotips:



Els animals IRS-1^{+/-} que es van fer servir per encreuar presentaven un fons genètic barreja entre les soques C57Bl/6 i C129/Sv, mentre que els transgènics MLC/GK tenien un fons genètic híbrid C57Bl/6xSJL. Així, els ratolins resultants del creuament presentaven un fons genètic barreja de tots aquests.

La genosupressió d'un al·lel d'IRS-1 va ser analitzada mitjançant Southern blot, mentre que la presència del gen quimèric MLC/GK va ser determinada per PCR (dades no mostrades). A més, la disminució en els nivells de proteïna IRS-1 en els animals IRS-1^{-/+} i GK+ IRS-1^{-/+}, va ser comprovada per Western blot.

2.2. EFECTE DE L'EXPRESSIÓ DE GK EN MÚSCUL ESQUELÈTIC DE RATOLINS IRS-1^{+/-} SOBRE LA INDUCCIÓ DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA PER UNA DIETA ALTA EN LÍPIDS.

Seguidament, es va procedir a estudiar si l'expressió de GK en múscul esquelètic permetia incrementar la captació de glucosa i millorar la sensibilitat a la insulina en el model de resistència a l'hormona prèviament caracteritzat, és a dir ratolins IRS-1^{+/-} alimentats amb una dieta alta en lípids. A més, aquest estudi també permetria analitzar el paper del múscul esquelètic en la contrarestració del desenvolupament de la resistència a la insulina i de la diabetis de tipus 2. Així doncs, amb aquesta finalitat es van sotmetre animals control, IRS-1^{+/-}, transgènics MLC/GK i animals GK+IRS-1^{+/-} a una dieta alta en lípids.

Durant els tres mesos en què es va realitzar la dieta alta en lípids, es va dur a terme un estudi de l'evolució del pes corporal i de la glucèmia. Per altra banda, també es van realitzar tests de tolerància a la insulina i a la glucosa. Posteriorment, després del sacrifici dels animals es van realitzar determinacions dels nivells sèrics de diferents hormones, com la insulina, la leptina i l'adiponectina.

2.2.1. Evolució del pes corporal.

Ratolins controls, transgènics MLC/GK, animals IRS-1^{+/-} i dobles GK+IRS-1^{+/-} van ser alimentats durant tres mesos amb una dieta alta en lípids. Durant la dieta es va realitzar un seguiment de l'increment de pes d'aquests animals al llarg del temps. Es va observar que els ratolins control incrementaven el seu pes corporal en un 25% respecte el pes inicial abans de començar la dieta (Figura 7). Els animals IRS-1^{+/-} i GK+ IRS-1^{+/-} presentaven un increment del 20% respecte del seu pes inicial, mentre que els ratolins MLC/GK només augmentaven de pes en un 15% (Figura 7). Això indicava que l'expressió de GK en múscul esquelètic atenuava l'increment de pes degut a la dieta alta en lípids en

ratolins controls, però no produïa una millora sobre l'augment de pes dels animals IRS-1^{+/-}.

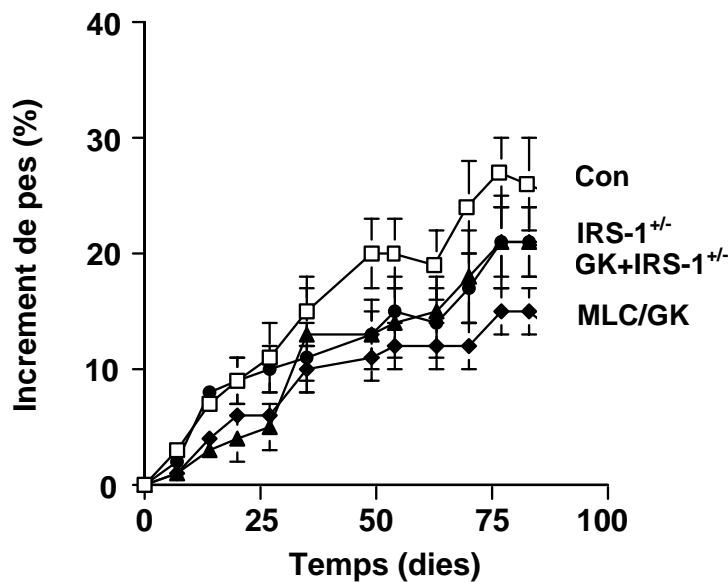


Figura 7. Evolució del pes corporal de ratolins controls (□), ratolins transgènics MLC/GK (◆), ratolins IRS-1^{+/-} (●), i ratolins GK+ IRS-1^{+/-} (▲) alimentats amb dieta alta en lípids durant tres mesos. Els resultats són les mitges ± SEM.

2.2.2. Estudi de la glucèmia i de la insulínèmia.

Durant el temps que va durar l'experiment es va realitzar també un seguiment de la glucèmia dels animals controls, transgènics MLC/GK, IRS-1^{+/-} i dobles GK+IRS-1^{+/-} alimentats amb dieta alta en lípids durant tres mesos. Es va observar que els animals transgènics MLC/GK presentaven uns valors de glucèmia lleugerament inferiors als

observats en animals controls. Per contra, animals IRS-1^{+/-} mostraven glucèmies lleugerament superiors, mentre que els dobles GK+IRS-1^{+/-} presentaven valors similars als mesurats en ratolins controls en dieta alta en lípids. Això indicava que l'expressió de GK en múscul esquelètic provocava una lleugera disminució en la glucèmia dels dos grups que expressaven l'enzim respecte els grups corresponents que no l'expressaven.

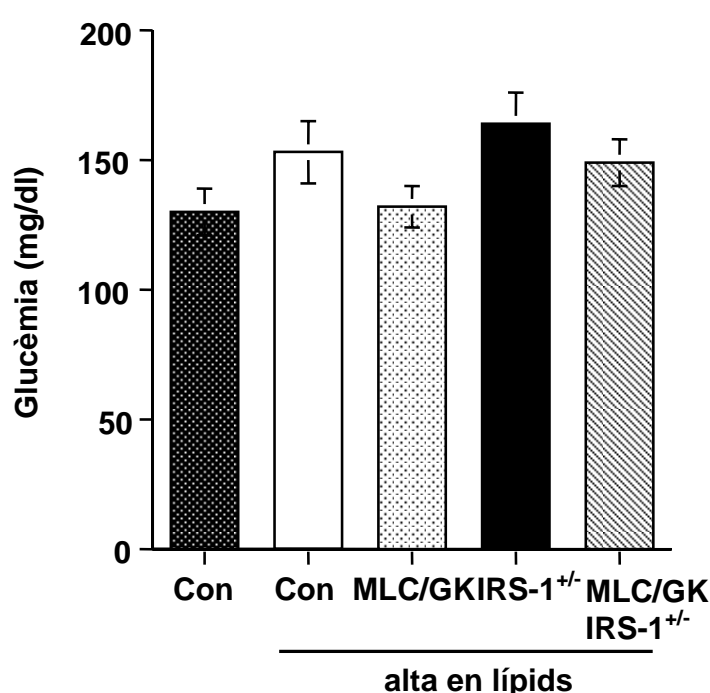


Figura 8. Anàlisi de la glucèmia en alimentació. Es va determinar la glucèmia en alimentació d'animals controls en dieta estàndard (Con, n=10) i controls (Con, n=9), transgènics MLC/GK (n=12), IRS-1^{+/-} (n=10), i GK+IRS-1^{+/-} (n=11) alimentats amb una dieta alta en lípids durant 3 mesos. Es van obtenir mostres de sang a partir de la vena caudal i es va mesura la glucèmia tal com es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats s'expressen com les mitges \pm SEM.

Després de 3 mesos en dieta alta en lípids, es va determinar la insulinèmia en alimentació dels diferents grups d'animals (Figura 9). Els animals controls mostraven un increment de 3.6 vegades respecte els valors normals d'insulinèmia amb una alimentació estàndard

(Figura 9). Per contra, els ratolins transgènics MLC/GK només assolien valors d'aproximadament la meitat que els mesurats en animals controls en dieta alta en lípids. D'altra banda, els animals IRS-1^{+/-} presentaven un increment proper al 40% en la insulina sèrica respecte els ratolins controls. Finalment, els ratolins GK+IRS-1^{+/-} presentaven nivells d'insulina similars als d'animals controls en dieta alta en lípids i inferiors als de IRS-1^{+/-}. Aquests resultats suggerien que l'expressió de GK en múscul esquelètic podria contrarestar parcialment el desenvolupament de la hiperinsulinèmia lligada als efectes diabetogènics de la dieta alta en lípids; efectes que, d'altra banda, estarien potenciats en els animals IRS-1^{+/-}.

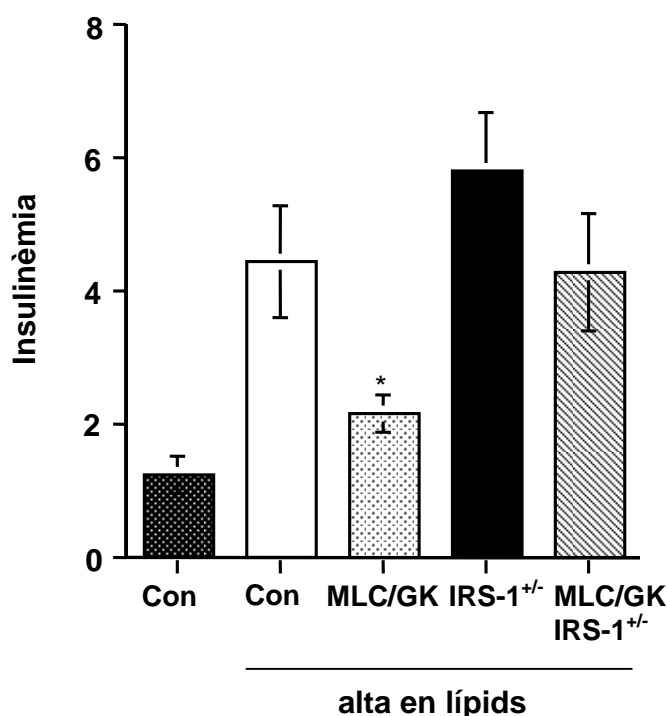


Figura 9. Anàlisi de la insulinèmia. Es va determinar la insulina sèrica de ratolins controls (Con, n=4) alimentats amb una dieta estàndard i d'animals controls (Con, n=9), transgènics MLC/GK (n=12), IRS-1^{+/-} (n=9), i GK+IRS-1^{+/-} (n=9) alimentats amb dieta alta en lípids durant tres mesos. Els resultats s'expressen com la mitja ± SEM. (*) p<0.05 vs Con alta en lípids.

2.2.3. Test de tolerància a la glucosa.

El test de tolerància a la glucosa és una de les proves més utilitzades en clínica per al diagnòstic de la resistència a la insulina lligada a diabetis tipus 2. Amb la finalitat de determinar si l'expressió de GK en múscul esquelètic permetria una millora en

l'homeòstasi de la glucosa en ratolins IRS-1^{+/-} després de dos mesos i mig en una dieta alta en lípids, es va realitzar un test de tolerància a la glucosa. Als 30 minuts de l'administració del sucre, els ratolins IRS-1^{+/-} arribaven a nivells de glucèmia del voltant de 450 mg/ml, mentre que els animals controls, els transgènics MLC/GK i els animals GK+IRS-1^{+/-} es mantien en nivells d'entre 300 i 350 mg/dl (Figura 10). L'increment en la glucèmia va ser transitori, i es van anar recuperant els nivells basals. Aquesta recuperació va ser lleugerament més ràpida en els animals controls, MLC/GK, GK+IRS-1^{+/-} que en els ratolins IRS-1^{+/-}. Aquests resultats indicaven que els ratolins IRS-1^{+/-} havien desenvolupat un estat de resistència a la insulina més marcat que els animals controls. En canvi, l'expressió de GK en múscul esquelètic d'animals alimentats amb una dieta alta en lípids portava a un increment en l'eliminació de la glucosa de la sang i, per tant, a una millora en la resistència a la insulina dels animals IRS-1^{+/-}.

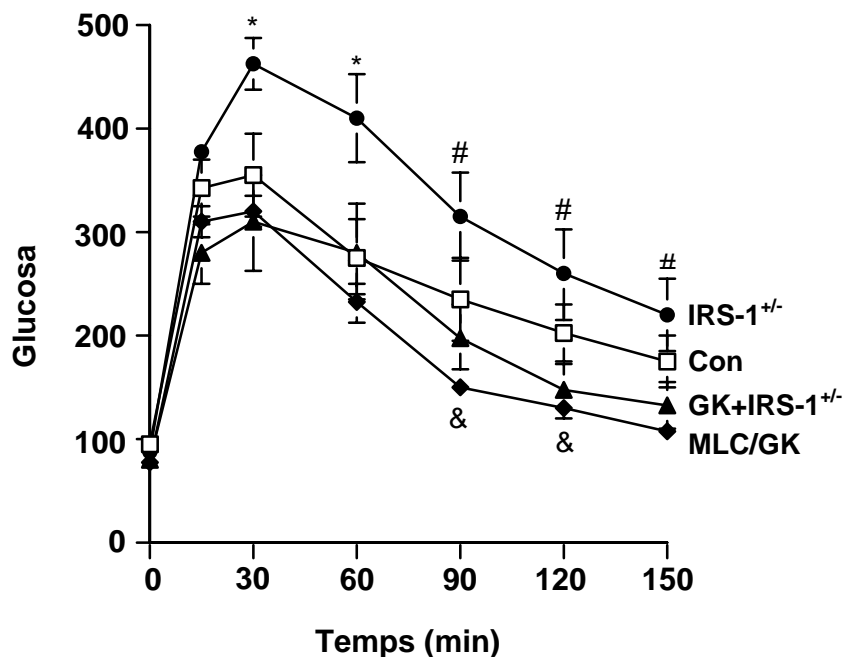


Figura 10. Test de tolerància a la glucosa. Ratolins controls (□), ratolins transgènics MLC/GK (◆), ratolins IRS-1^{+/-} (●), i ratolins GK+IRS-1^{+/-} (▲) dejunats 16 h varen ser sotmesos a un test de tolerància a la glucosa. Es va administrar per via intraperitoneal 1 mg de glucosa per gram de pes viu i a continuació es varen realitzar determinacions de la concentració de glucosa en sang al llarg del temps. Els resultats estan expressats com la mitja ±SEM de 7 ratolins per grup. (*) p<0.05 vs Con, GK+IRS-1^{+/-} i MLC/GK. (#) p< 0.05 vs GK+IRS-1^{+/-} i MLC/GK. (&) p<0.05 vs Con.

2.2.4. Test de tolerància a la insulina.

Per tal de determinar si l'expressió de GK en múscul esquelètic d'animals IRS-1^{+/-} alimentats amb una dieta alta en lípids permetia millorar la sensibilitat a la insulina, es va realitzar un test de tolerància a l'hormona. Es va administrar als animals una dosi intraperitoneal de 0.75 UI d'insulina soluble per kg de pes. Es van obtenir mostres de sang a partir de la vena de la cua als temps indicats, i els valors obtinguts es van representar com a percentatge de glucosa respecte els nivells basals (Figura 11). Així, es va observar que en els ratolins IRS-1^{+/-} alimentats amb dieta alta en lípids la disminució de la glucèmia al llarg del temps només assolía valors propers al 15% als 15 i 30 min de la injecció d'insulina. Per contra, els ratolins MLC/GK disminuïen la seva glucèmia fins arribar a nivells de gairebé el 50% als 30 minuts de l'administració de l'hormona. D'altra banda, en els animals controls i GK+IRS-1^{+/-} s'observava una baixada de la glucèmia d'aproximadament un 30% als 15 minuts. La disminució en al glucèmia era transitoria i els animals recuperaven els valors basals de forma gradual. Aquesta recuperació es produïa de forma més ràpida en els animals IRS-1^{+/+}, que als 45 minuts ja presentaven valors de glucèmia superiors al 100%. En canvi, els ratolins transgènics MLC/GK retornaven als nivells basals de forma molt més gradual, assolint valors del 80% de la glucèmia inicial als 60 minuts. Els animals controls i IRS-1^{+/-}-MLC/GK presentaven un comportament intermig, assolint valors propers al 100% als 60 minuts de la injecció d'insulina. Això indicava que la deficiència d'IRS-1 produïa un increment de la resistència a la insulina en dieta alta en lípids, i que per contra l'expressió de GK en múscul esquelètic d'aquests ratolins induïa un increment de la sensibilitat als efectes hipoglucèmics de l'hormona. Així doncs, aquesta millora en la sensibilitat a la insulina deguda a l'expressió de GK permetia contrarestar la resistència a l'hormona causada per la supressió parcial d'IRS-1, de forma que els animals dobles transgènics presentaven un comportament similar al dels animals controls alimentats amb dieta alta en lípids.

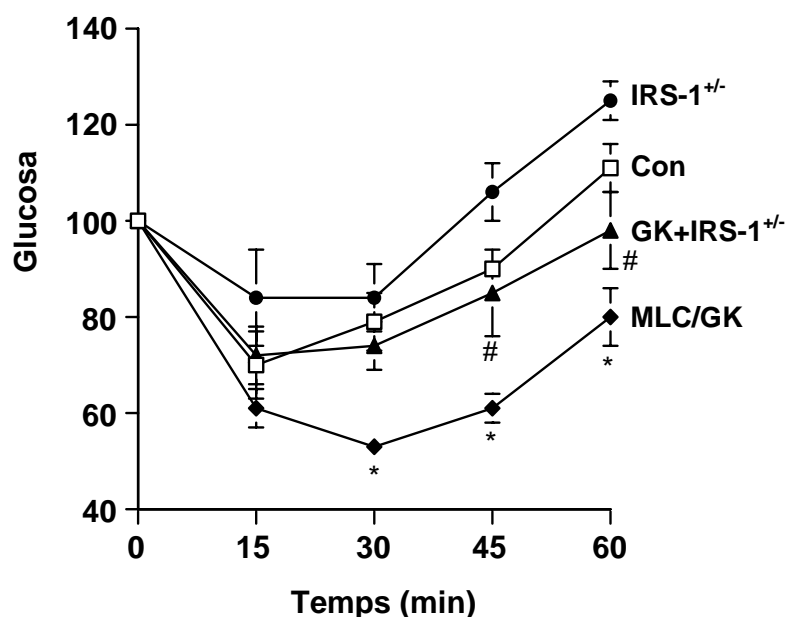


Figura 11. Test de tolerància a la insulina. Percentatge de disminució de la glucèmia respecte al temps. Es va injectar 0.75 U/Kg de pes d'insulina soluble a ratolins controls (□), ratolins transgènics MLC/GK (◆), ratolins IRS-1^{+/-} (●), i ratolins GK+IRS-1^{+/-} (▲). Les mostres de sang es van prendre a partir de la vena caudal dels animals en els temps indicats, i es va determinar la glucèmia tal com es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats són les mitges ±SEM de 4 animals per grup en el cas de controls i IRS-1^{+/-}, 6 animals MLC/GK i 7 animals MLC/GK- IRS-1^{+/-}. (*) $p < 0.05$ vs Con. (#) $p < 0.05$ vs IRS-1^{+/-}.

2.2.5. Estudi dels nivells de leptina i adiponectina.

La leptina i l'adiponectina són dues adipoquines, molècules secretades específicament pels adipòcits. S'ha descrit que aquestes adipoquines tenen un paper important en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa i dels lípids. Per tant, es va determinar la concentració d'adiponectina i leptina en sèrum d'animals controls, transgènics MLC/GK, IRS-1^{+/-}, i GK+IRS-1^{+/-} alimentats amb una dieta alta en lípids. La leptina es va mesurar mitjançant la tècnica d'ELISA, mentre que els nivells d'adiponectina sèrica van ser determinats per radioimmunoassaig. Així, es va observar que els ratolins MLC/GK mostraven una disminució tant en els nivells de leptina com d'adiponectina respecte dels ratolins controls. Per contra, els ratolins IRS-1^{+/-} presentaven un increment en les dues

adipoquines. D'altra banda, els animals GK+IRS-1^{+/-}, presentaven nivells de leptina i adiponectina similars als mesurats en ratolins controls (Figura 12).

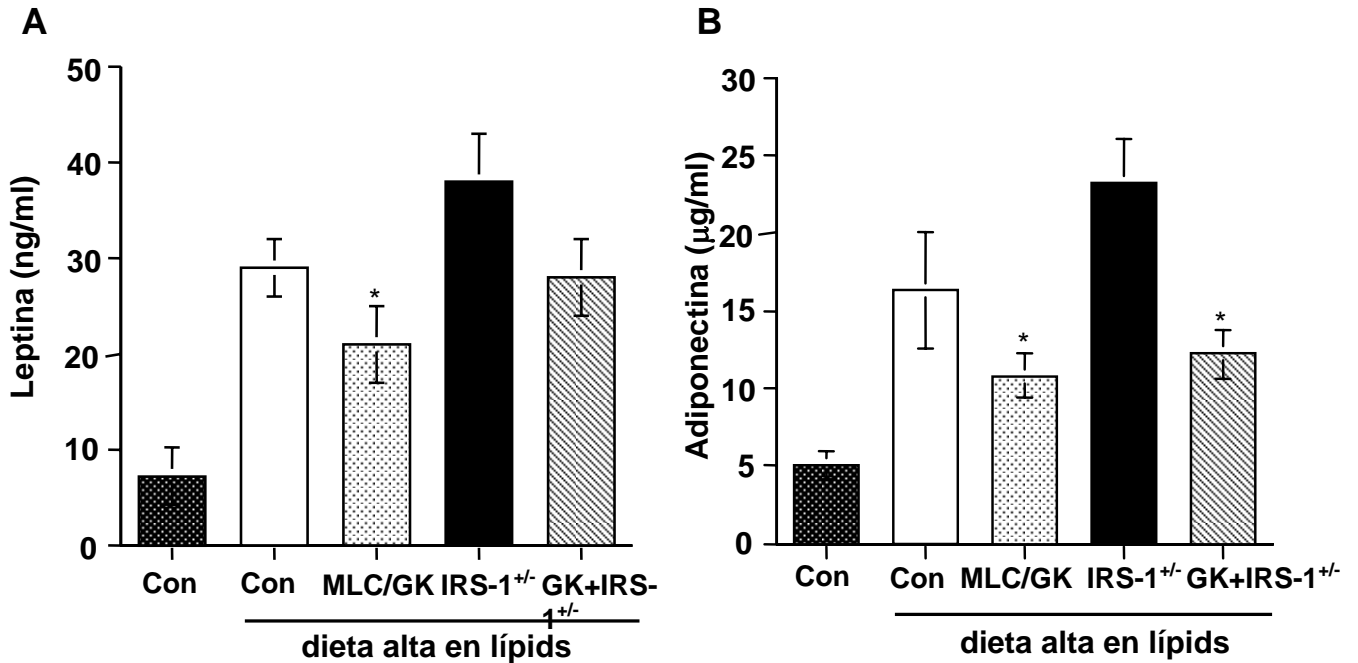


Figura 12. Nivells de leptina i adiponectina sèriques. Després de 3 mesos de dieta alta en lípids, es van mesurar les concentracions de (A) leptina i (B) adiponectina circulants en sèrum de ratolins controls (Con, n=4) alimentats amb una dieta estàndard i d'animals controls (Con, n=9), transgènics MLC/GK (n=12), IRS-1^{+/-} (n=9) i MLC/GK- IRS-1^{+/-} (n=9) sotmesos a una dieta alta en lípids. Els resultats s'expressen com la mitja ± SEM. (*) p<0.05 vs IRS-1^{+/-} .

Així doncs, en el nostre estudi hem analitzat l'efecte de l'increment de la fosforilació de glucosa en múscul esquelètic sobre la prevenció de la resistència a la insulina i l'obesitat. Amb aquesta finalitat, s'ha estudiat l'efecte diabetogènic d'una dieta alta en lípids sobre animals que expressen GK en múscul esquelètic. També s'ha estudiat l'efecte de l'expressió de GK en múscul esquelètic del model de resistència a la insulina caracteritzat a l'apartat anterior, els ratolins IRS-1^{+/-} alimentats amb una dieta alta en lípids. Ja s'havia observat prèviament que els ratolins transgènics que expressen GK en múscul esquelètic presentaven un increment en la captació de glucosa per aquest teixit quan s'alimenten amb una dieta estàndard (Otaegui, 2000).

En primer lloc, en aquest treball es va observar que els animals que expressaven GK en múscul esquelètic mostraven un increment de pes menor que els controls quan eren alimentats amb una dieta alta en lípids. Això suggeria que l'increment en la fosforilació de la glucosa pel múscul esquelètic degut a l'expressió de GK prevenia l'aparició d'obesitat en ratolins alimentats amb una dieta d'alt contingut en greixos. Per contra, en animals amb aquest tipus d'alimentació, la sobreexpressió de GLUT4 prevé el desenvolupament d'hiperglucèmia però no l'aparició d'obesitat (Ikemoto, 1995; Marshall, 1999). A més, ratolins transgènics que sobreexpressen GLUT1 en múscul esquelètic alimentats amb una dieta alta en lípids presenten una millora en la tolerància a la glucosa, però desenvolupen resistència a la insulina i obesitat (Marshall, 1999). Així, aquestes i altres evidències confirmen que la fosforilació de la glucosa és un punt clau en la utilització del sucre pel múscul esquelètic (Rothman, 1992; Pendregrass, 1998).

A més, l'expressió de GK en múscul esquelètic millorava la tolerància a la glucosa en ratolins en dieta alta en lípids. S'havia descrit prèviament que els ratolins transgènics MLC/GK alimentats amb una dieta alta en lípids presenten un increment en la captació de glucosa, i es mantenen normoglucèmics, mentre que els ratolins controls desenvolupen hiperglucèmia (Otaegui, 2003). Aquests animals també mostren una millora en la resistència a la insulina i en la tolerància a la glucosa respecte dels animals controls, en els quals aquests paràmetres es troben alterats degut a l'alimentació amb alt contingut en greixos (Otaegui, 2003). Això suggereix que l'increment en la fosforilació de la glucosa al múscul esquelètic mitjançant l'expressió de GK contraresta els efectes diabetogènics d'una dieta alta en lípids. La millora global en la tolerància a la glucosa s'havia descrit prèviament en ratolins transgènics que sobreexpressen GK en fetge (Ferre, 1996; Hariharan, 1997; Niswender, 1997) o amb la transferència gènica d'adenovirus amb el gen de la GK en fetge de rata (Morral, 2002) o en múscul esquelètic (Jiménez Chillarón, 1999). A més, ratolins transgènics que sobreexpressen GK al fetge poden contrarestar les alteracions característiques de la diabetis de tipus 2 (Shiota, 2001).

També hem observat que l'expressió de GK en múscul esquelètic de ratolins alimentats amb una dieta alta en lípids millora la resistència a la insulina d'aquests animals. La resistència a la insulina en múscul esquelètic és particularment important degut a que és el principal lloc de captació de glucosa estimulada per l'hormona. Aquest descens en la

captació pot ser degut a defectes en el transport o la fosforilació de la glucosa, o bé en la síntesi de glucogen (Bonadonna, 1996; Thorburn, 1991; Cline, 1999). S'han descrit fenotips similars de millora en la sensibilitat a l'hormona en animals que tenen alterada alguna proteïna reguladora de l'acció de la insulina, com per exemple, els ratolins genosuprimits en PTP-1B (Elchebly, 1999; Klamon, 2000). La PTP-1B és una fosfatasa que regula negativament la senyalització de la insulina mitjançant la desfosforilació en tirosines del receptor de l'hormona. Els ratolins que no tenen PTP-1-B presenten un increment en la sensibilitat a la insulina, una disminució de les concentracions de glucosa i insulina sanguínies i una millora en la tolerància a la glucosa; així com resistència a l'augment de pes i millora de la sensibilitat a la insulina quan s'alimenten amb dieta alta en lípids (Elchebly, 1999; Klamon, 2000). Un altre cas seria el dels ratolins amb genosupressió del gen de la subunitat reguladora de PI-3-K, p85 α . Aquests animals mostren una sensibilitat a la insulina augmentada i hipoglucèmia deguda a l'increment en la captació de glucosa en múscul esquelètic i teixit adipós (Terauchi, 1999). Així, l'expressió de GK també produeix una situació similar de millora en la sensibilitat a la insulina, tot i que els mecanismes pels quals es produeix aquest efecte encara són desconeguts.

Per altra banda, en aquest estudi s'ha observat que els ratolins GK+IRS-1^{+/-} presenten una millora en la tolerància a la glucosa i en la sensibilitat a la insulina respecte als ratolins IRS-1^{+/-}, ambdós sotmesos a una dieta alta en lípids. No obstant, no es produeix una normalització completa, sinó que els animals GK+ IRS-1^{+/-} es comporten de manera similar als ratolins controls alimentats amb dieta alta en lípids. Això suggereix que l'expressió de GK en múscul esquelètic d'aquests animals podria contrarestar només parcialment els efectes additius de la mutació en IRS-1 i la dieta alta en lípids sobre el desenvolupament d'intolerància a la glucosa i resistència a la insulina. Aquesta compensació parcial estaria d'acord amb els resultats observats en rates Zucker diabètiques, en les quals l'expressió de GK en múscul esquelètic millora la captació de glucosa estimulada per insulina però no és suficient per prevenir els nivells elevats de glucosa i d'insulina associats a l'obesitat severa d'aquest model animal (Jimenez-Chillaron, 2000).

La leptina i l'adiponectina són dues adipoquines secretades pel teixit adipós. En el nostre estudi hem observat que els ratolins IRS-1^{+/-} presenten un increment en els nivells d'aquestes dues hormones respecte els animals controls, ambdós sotmesos a dieta alta

en lípids. Això està d'acord amb el fet que freqüentment els pacients amb obesitat i diabetis de tipus 2 presenten nivells elevats de leptina plasmàtica i resistència a la leptina (Widjaja, 1997). Per contra, en dieta alta en lípids, els ratolins MLC/GK mostren una disminució en la concentració de les dues adipoquines, mentre que els dobles GK+ IRS-1^{+/-} presenten nivells similars als animals controls. S'ha descrit que la leptina incrementa la captació de glucosa estimulada per insulina en múscul esquelètic de ratolins normals (Yaspelkis, 1999) i resistents a la insulina (Yaspelkis, 2001), i que el tractament amb leptina *in vivo* incrementa la captació i eliminació de glucosa (Kamohara, 1997). També s'ha postulat que el tractament perllongat amb leptina *in vivo* disminueix la quantitat de greix visceral i potencia l'acció de la insulina sobre la inhibició de la producció hepàtica de glucosa i sobre l'estimulació de la captació del sucre (Barzilai, 1997). A més, s'ha demostrat que la leptina inhibeix la secreció d'insulina (Kieffer, 1997) i que el tractament amb leptina podria protegir els illots pancreàtics contra l'apoptosi induïda per l'obesitat i la resistència a la insulina (Wang, 1998; Shimabukuro, 1998). D'altra banda, es creu que l'adiponectina també incrementa la sensibilitat a la insulina (Yamauchi, 2001; Beltowsky, 2003). S'ha descrit que l'adiponectina està sobrerregulada en les primeres etapes de l'obesitat induïda mitjançant dieta, quan l'expansió d'adipocits està activada (Li, 2002) i en canvi està disminuïda en obesitat de llarga durada i en diabetis de tipus 2, quan els adipocits presenten hipertròfia (Hu, 1996; Arita, 1999; Fruebis, 2001). Un increment moderat en els nivells sèrics d'adiponectina podria conferir propietats antidiabètiques mitjançant una disminució de la producció de glucosa hepàtica i l'estimulació de l'oxidació d'àcids greixosos lliures en teixits sensibles a la insulina (Combs, 2001; Yamauchi, 2001). Així, els nivells elevats d'adiponectina podrien protegir els teixits com múscul o fetge de la resistència a la insulina induïda per lipotoxicitat. Per tant, és probable que en els animals IRS-1^{+/-}, en els quals es dona una major resistència a la insulina, es produeixi un increment en els nivells d'adipoquines com a resposta compensatòria per contrarestar aquest defecte en l'acció de l'hormona. Per contra, en els ratolins MLC/GK, que mostren una sensibilitat a la insulina major que els controls, es produeix un descens dels nivells d'adipoquines possiblement degut a que no cal aquesta potenciació de l'efecte de l'hormona.

Així, s'observava una millora en la sensibilitat a la insulina i en la tolerància a la glucosa del model animal de resistència a l'hormona que havíem caracteritzat en l'apartat anterior. Per una banda, els ratolins IRS-1^{+/-} presentaven un increment en la resistència a la

insulina, i per altra, els transgènics MLC/GK mostraven una millora en la sensibilitat a l'hormona respecte dels animals controls en dieta alta en lípids. Amb la combinació dels dos genotips es produïa una compensació d'ambdós efectes, de forma que els animals GK+IRS-1^{+/-} resultants es comportaven de manera similar als controls en dieta alta en lípids. Per tant, aquests resultats suggerien que l'expressió de GK en múscul esquelètic permetia contrarestar parcialment la resistència a la insulina potenciada per la combinació de la genosupressió parcial d'IRS-1 i l'alimentació rica en greixos.

3. ELECTROTRANSFERÈNCIA *IN VIVO* DEL GEN DE LA GK A MÚSCUL ESQUELÈTIC DE RATOLINS IRS-1^{-/-}.

En aquest estudi havíem observat que l'expressió de l'enzim GK en múscul esquelètic permetia contrarestar la resistència a la insulina dels animals controls i també parcialment la dels ratolins IRS-1^{+/-} sotmesos a una dieta alta en lípids, tot i que en aquests últims no es produïa un efecte sobre l'obesitat causada per aquest tipus d'alimentació. Així doncs, ens vam plantejar expressar la GK en múscul esquelètic d'un model de resistència a la insulina sense obesitat, com ara els ratolins homozigots per la supressió en IRS-1 (IRS-1^{-/-}). Per tal de poder aplicar posteriorment aquesta aproximació com a tractament factible, caldria introduir el gen desitjat en el teixit diana utilitzant algun dels mètodes de transferència gènica que hi ha descrits i que presenti elevada eficiència i seguretat. Un dels mètodes emprats en teràpia gènica *in vivo* és la injecció directa de DNA a múscul esquelètic. S'ha demostrat que la tècnica d'electrotransferència incrementa molt el procés de transfecció del DNA a la fibra muscular (Mir, 1999; Bettan, 2000). Per tant, en aquesta part de l'estudi, es va realitzar electrotransferència del gen de la GK en múscul esquelètic *in vivo* com a aproximació de teràpia gènica per millorar la resistència a la insulina.

3.1. ELECTROTRANSFERÈNCIA DEL GEN DE LA GK A MÚSCUL ESQUELÈTIC DE RATOLINS GENOSUPRIMITS EN IRS-1.

Per dur a terme aquesta part de l'estudi vam triar el model animal de resistència a la insulina prèviament descrit, els ratolins genosuprimits IRS-1^{-/-} (Araki, 1994; Tamemoto, 1994). Els ratolins IRS-1^{-/-} presenten resistència a la insulina acompanyada d'hiperinsulinèmia, així com intolerància a la sobrecàrrega de glucosa. L'objectiu d'aquesta part de l'estudi va ser determinar si l'electrotransferència del gen de la GK en múscul esquelètic de ratolins IRS-1^{-/-} permetia aconseguir una millora en la sensibilitat als efectes de la insulina i un increment en la captació de glucosa.

L'electrotransferència de DNA plasmídic en solució és una de les tècniques més eficaces per a la transferència de gens a múscul esquelètic. Els avantatges de l'electrotransferència gènica *in vivo* són els següents:

- 1) S'evita l'ús de vectors virals, reduint costos i problemes de bioseguretat, i evitant els problemes causats per la formació d'anticossos contra el vector viral.
- 2) L'electroporació per a la transferència gènica *in vivo* és altament eficient. En particular, en teixit muscular, on les miofibres presenten una gran longevitat, les transferències gèniques induïdes per electroporació que, de fet, s'han de considerar com a transfeccions transitòries, esdevenen permanents i amb expressió a llarg termini.
- 3) L'àrea on el gen és transferit és clarament delimitada pels electròdes. Aleshores, la transferència gènica pot ser dirigida a una determinada àrea.

S'ha descrit que l'electrotransferència amb tractament previ amb hialuronidasa permet transferir una major àrea muscular, produir un mínim dany tissular i obtenir una major quantitat de proteïna produïda (McMahon, 2001; Mas, 2003). Per aquest motiu, ratolins homozigots per la genosupressió d'IRS-1 van ser electrotransferits, previ tractament amb hialuronidasa, amb el gen quimèric CMV/GK o amb el gen quimèric control CMV/ β -gal. La transfecció es va realitzar en els músculs gastrocnemius, tibialis anterior i quadricèps, amb una dosi de 50 micrograms de DNA/múscul dissolt en solució salina. Després de la injecció del DNA plasmídic s'aplicava un camp elèctric de 175V/cm, 10 polsos, 20 ms i 1 Hz de freqüència.

3.1.1. Estudi de l'expressió del gen de la GK en múscul esquelètic de ratolins genosuprimits per IRS-1.

Sis setmanes després de l'electrotransferència de GK en músculs de ratolins IRS-1^{-/-}, es va procedir al sacrifici dels animals i a la dissecció dels músculs tractats. Posteriorment, es va voler estudiar l'expressió del gen de la GK en aquests músculs, i per això es va realitzar aïllament de mRNA total i anàlisi per Northern blot. En els músculs de ratolins IRS-1^{-/-} electrotransferits amb GK es va detectar un transcrit que hibridava amb la sonda corresponent al cDNA de la GK, mentre que no es produïa hibridació en l'RNA procedent de músculs de ratolins controls IRS-1^{-/-} (Figura 13).

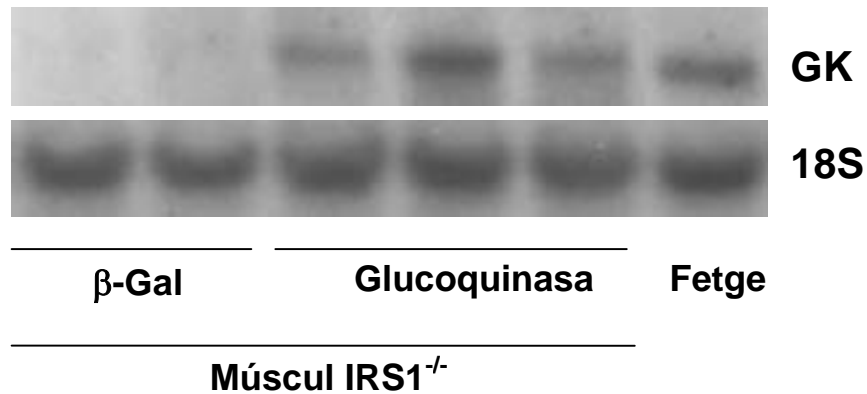


Figura 13. Expressió de GK en múscul esquelètic de ratolins genosuprimits per IRS-1. Anàlisi per Northern blot dels nivells d'expressió del gen de la GK en múscul. Es va aïllar RNA total de múscul d'animals IRS-1^{-/-} electrotransferits amb β-gal o amb GK, així com RNA de fetge. Es va hibridar amb sondes corresponents als cDNAs i la GK de rata. Per tal d'estandaritzar es va hibridar amb sonda 18s. Es mostra un Northern blot representatiu.

3.1.2. Determinació de la captació de glucosa en múscul esquelètic.

Seguidament, es va analitzar si el múscul esquelètic dels ratolins que expressaven GK presentava un increment en la captació de glucosa. Amb aquesta finalitat es va mesurar la captació de 2-deoxiglucosa en ratolins IRS-1^{-/-} controls i electrotransferits amb GK en múscul esquelètic. Es va observar un increment de dues vegades en la captació de 2-deoxiglucosa als quadriceps de ratolins IRS-1^{-/-} que expressaven GK respecte músculs de ratolins IRS-1^{-/-} controls. A més, també s'observava aquest increment en el cas del múscul gastrocnemius d'animals electrotransferits amb GK respecte els controls (Figura 14). Això indicava que l'expressió de GK mitjançant electrotransferència en múscul esquelètic de ratolins IRS-1^{-/-} produïa una millora en la captació de glucosa, probablement degut a un increment de la seva metabolització.

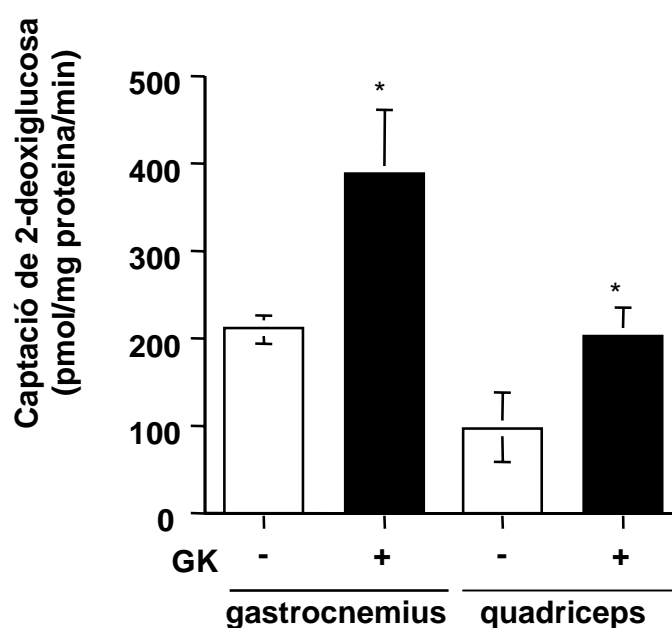


Figura 14. Captació de 2-deoxiglucosa en múscul esquelètic de ratolins IRS-1^{-/-}. Es va injectar per via intravenosa 1 Ci de l'anàleg de glucosa no metabolitzable 2-[1-³H]deoxi-D-glucosa en ratolins genosuprimits en IRS-1 controls (-) i electrotransferits amb GK (+) alimentats. 30 min després de la injecció es van agafar mostres de músculs en els quals es va mesurar l'acumulació de compostos marcats radioactivament segons es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats són les mitges ±SEM de 3 animals a cada grup.

3.1.4. Anàlisi de la glucèmia i insulinèmia.

En aquest estudi es va realitzar una anàlisi de la glucèmia i de la insulinèmia en alimentació. La glucèmia es va determinar a partir de la vena de la cua en ratolins IRS-1^{-/-}/β-gal controls i IRS-1^{-/-} electrotransferits amb GK. Així, abans de l'electrotransferència, tots els ratolins IRS-1^{-/-} mostraven una glucèmia propera als 150 mg/dl en alimentació.

Després de l'electrotransferència, no s'observaven diferències significatives en els nivells de glucosa sanguínia dels animals IRS-1^{-/-} electrotransferits amb GK respecte els ratolins IRS-1^{-/-}/β-gal controls en condicions d'alimentació (Figura 15A). Ambós grups presentaven valors de glucèmia lleugerament inferiors als mesurats abans de l'electrotransferència, probablement degut a l'efecte del procés en si. Aquests resultats indicaven que l'expressió de GK en múscul esquelètic de ratolins IRS-1^{-/-} no es traduïa en una disminució sobre la glucèmia d'aquests animals.

Per valorar els efectes de l'electrotransferència de GK en múscul esquelètic de ratolins IRS-1^{-/-} sobre els nivells circulants d'insulina, es va procedir a determinar la concentració de l'hormona en condicions d'alimentació cinc dies després de l'electrotransferència. Aquesta determinació es va realitzar mitjançant la tècnica d'ELISA. Es va observar que, el dia 5 després de l'electrotransferència, els ratolins IRS-1^{-/-} electrotransferits amb GK presentaven una disminució del 43% en la insulinèmia respecte els animals IRS-1^{-/-} controls (Figura 15B).

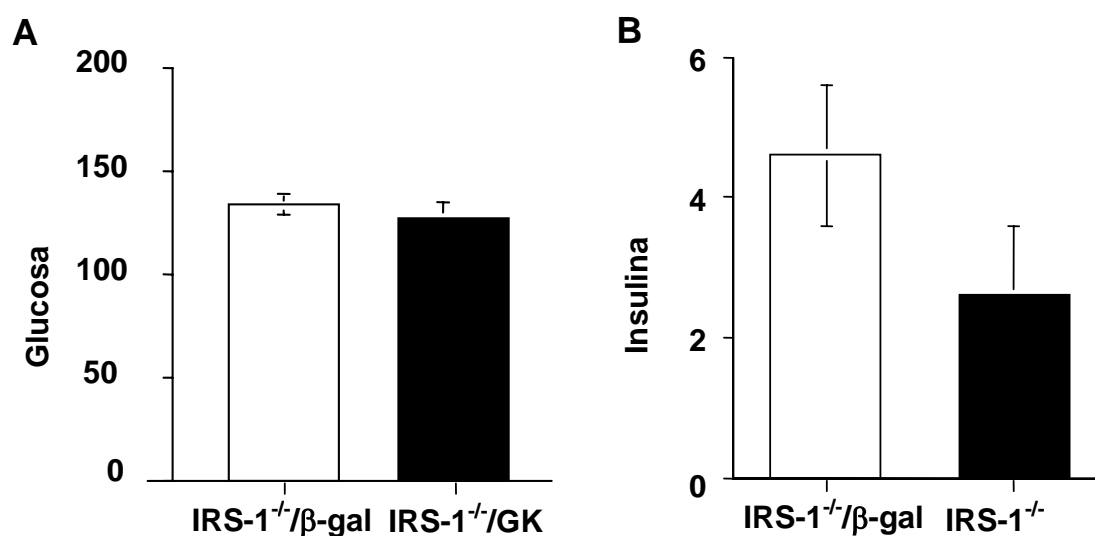


Figura 15. Anàlisi de la glucèmia (A) i de la insulinèmia (B) en alimentació. Sis setmanes després del tractament d'electrotransferència amb el gen de la GK o amb el gen marcador β-gal es van determinar els nivells de glucosa en sang (A) i la concentració d'insulina sèrica (B) en estat d'alimentació. Es representa la mitja ± SEM de 6 animals electrotransferits amb CMV/β-gal i 4 animals electrotransferits amb CMV/GK. També es mostra la glucèmia anterior a l'electrotransferència dels animals dels dos grups conjuntament.

3.1.5. Test de tolerància a la insulina.

Per tal de determinar si l'expressió mitjançant electrotransferència de GK en múscul esquelètic de ratolins IRS-1^{-/-} produïa una millora en la sensibilitat als efectes de la insulina, es va realitzar un test de tolerància a la hormona. Es va administrar als animals una dosi intraperitoneal de 0.75 UI d'insulina soluble per kg de pes. Es van obtenir mostres de sang a partir de la vena de la cua als temps indicats, i els valors obtinguts es van representar com a percentatge de glucosa respecte els nivells basals (Figura 16). Així, es va observar que en els ratolins controls IRS-1^{-/-} la disminució de glucèmia al llarg del temps només assolía valors propers al 25% als 30 min de la injecció d'insulina. Per contra, els ratolins IRS-1^{-/-} electrotransferits amb GK disminueixen la seva glucèmia fins arribar a nivells del 60% als 30 minuts de l'administració de l'hormona. Això indicava que l'expressió per electrotransferència de GK en múscul esquelètic de ratolins genosuprimits en IRS-1 induïa un increment de la sensibilitat als efectes hipoglucemiants de la insulina.

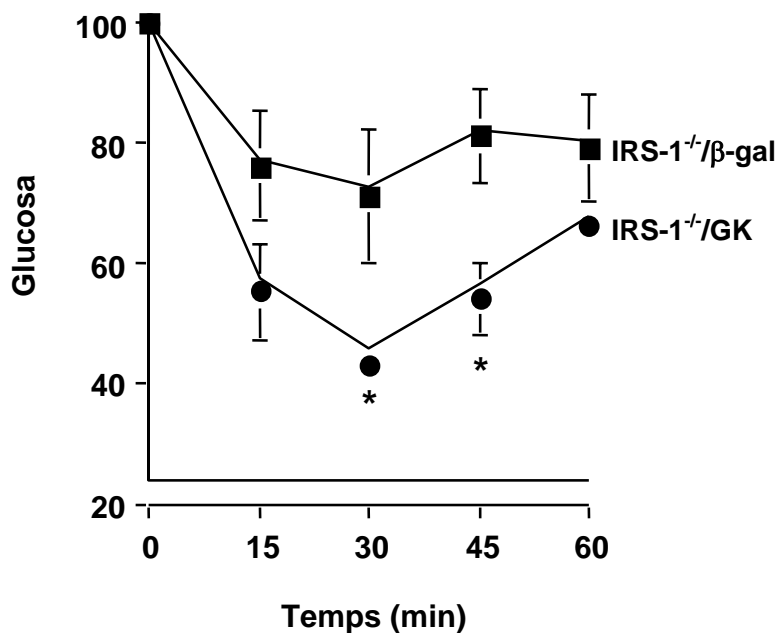


Figura 16. Test de tolerància a la insulina. Percentatge de disminució de la glucèmia respecte al temps. Es va injectar 0.75 U/Kg de pes d'insulina soluble a ratolins IRS-1^{-/-} controls (■) i a ratolins IRS-1^{-/-} electrotransferits amb GK (●). Les mostres de sang es van prendre a partir de la vena caudal dels animals en els temps indicats, i es va determinar la glucèmia tal com es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats són les mitjanes ±SEM de 6 animals en el cas dels controls i 4 animals electrotransferits amb GK.

Així doncs, en aquesta part de l'estudi vàrem investigar l'efecte de l'expressió de la GK en un model animal de resistència a la insulina sense obesitat, els ratolins IRS-1^{-/-}. No obstant, calia aprofundir i optimitzar les tècniques de transferència gènica *in vivo*, mitjançant l'ús de vectors virals o no virals, a aquest o altres models animals de diabetis de tipus 2. En aquest treball es va triar l'electrotransferència de DNA perquè és una tècnica que té múltiples avantatges, entre ells, una elevada eficiència i una reducció en els costos i els problemes de seguretat, ja que s'evita la utilització de vectors virals. Aquesta tècnica ha estat molt utilitzada per a la transferència de gens a múscul esquelètic (Maruyama, 2000), a fetge (Heller, 2000), a testicles (Yamazaki, 2000), pell (Johnson, 1998), cor (Harrison, 1998), etc. A més, durant els últims anys s'han descrit diferents protocols d'electrotransferència que han aconseguit un guany en l'eficiència de la transfecció i el nivell d'expressió, així com una minimització del dany tissular. Les condicions utilitzades en aquest estudi requereixen un pretractament del múscul esquelètic amb l'enzim hialuronidasa (McMahon, 2001). Aquest enzim degrada l'àcid hialurònic del teixit conjuntiu que envolta les fibres musculars, de forma que permet que el DNA injectat tingui accés a una àrea muscular més àmplia. Per altra banda, aquest tractament amb hialuronidasa permet una reducció del voltatge del camp elèctric que cal aplicar, de forma que es minimitza el dany tissular produït per l'ús de la tècnica. S'ha descrit que el petit dany tissular observat en aplicar aquestes condicions d'electrotransferència es deu, principalment, al procediment d'injecció més que a l'aplicació del camp elèctric, i que aquest dany desapareix dues setmanes després de la realització del tractament (Mas, 2003).

Una vegada escollides les condicions d'electrotransferència, es va estudiar si l'expressió de GK mitjançant aquesta tècnica permetria millorar la resistència a la insulina d'un altre model de diabetis de tipus 2, els animals IRS-1^{-/-}. S'havia observat prèviament que els ratolins homozigots per la genosupressió d'IRS-1 són resistents als efectes hipoglucèmians de la insulina i mostren una tolerància a la glucosa lleugerament alterada (Araki, 1994; Tamemoto, 1994). Això va associat a una alteració en la captació de glucosa estimulada per insulina i a un defecte en la translocació de GLUT4 (Araki, 1994). En el nostre estudi, es va aconseguir expressar l'enzim GK en múscul d'aquests ratolins mitjançant l'ús de l'electrotransferència *in vivo*. Podria ser que, amb el temps, es produís una disminució de l'expressió del gen degut a la pèrdua progressiva del DNA plasmídic de les cèl.lules electrotransferides, o bé a la inactivació del promotor CMV. No obstant, en el

nostre estudi vam observar que l'expressió de l'enzim es manté durant les sis setmanes que va durar l'experiment. A més, es va observar un increment en la captació de glucosa per part de les fibres musculars dels ratolins IRS-1^{-/-} que han estat electrotransferides amb GK. Aquest augment en la captació de glucosa permet millorar la resposta d'aquests animals a l'administració d'insulina en realitzar un test de tolerància a l'hormona. Així doncs, després de la injecció d'insulina, els ratolins IRS-1^{-/-} electrotransferits amb GK presenten un increment en la sensibilitat a l'hormona respecte dels ratolins IRS-1^{-/-} controls, que són resistents. Això estaria d'acord amb els resultats observats en els animals IRS-1^{+/-} alimentats amb dieta alta en lípids, on l'expressió de GK també resulta en una millora de la sensibilitat a la insulina, així com amb les observacions realitzades en ratolins MLC/GK alimentats amb una dieta alta en lípids (Otaegui, 2003).

El múscul esquelètic constitueix, aproximadament, un 40% de la massa corporal. Cal tenir en compte que en aquest estudi només es va realitzar electrotransferència dels músculs *gastrocnemius*, *quàdriceps* i *tibialis anterior*. Així, la quantitat de teixit muscular que expressa el gen és molt menor amb aquesta tècnica de transferència gènica que en el cas anterior dels ratolins transgènics, on la GK s'expressa en un nombre major de fibres. Per tant, els resultats obtinguts suggereixen que la modificació d'aquest petit percentatge de la massa muscular és suficient per produir una sensibilització als efectes de la insulina.

Tots aquests resultats suggereixen que l'augment en la fosforilació de la glucosa degut a l'expressió de glucoquinasa en múscul esquelètic, mitjançant electrotransferència gènica, té com a resultat una millora en la resistència a la insulina dels animals IRS-1^{-/-}, així com un increment en la captació de glucosa per aquest teixit. Així doncs, els resultats obtinguts en aquesta part de l'estudi confirmen que l'expressió de GK en múscul esquelètic podria resultar una bona aproximació terapèutica per millorar la resistència a la insulina en la diabetis de tipus 2, l'obesitat o altres condicions de resistència a la insulina. Les característiques del múscul esquelètic i la seva accessibilitat faciliten que es puguin dur a terme estudis de transferència gènica en aquest teixit. La naturalesa postmitòtica i la longevitat de les fibres musculars assegura l'expressió dels gens transferits durant un període de temps llarg, i alhora elimina la necessitat d'administrar dosis repetides en intervals de temps breus. No obstant, cal realitzar més investigacions per tal de millorar i desenvolupar els vectors, virals o no virals, amb els quals dur a terme aquest tipus de tractament alternatiu a les teràpies actuals.

Per tant, tots els resultats obtinguts en aquesta segona part del treball confirmen l'efecte de la glucoquinasa sobre la resistència a la insulina. Així, l'expressió de GK produeix un increment en la sensibilitat a l'hormona en dos models animals de resistència a la insulina: per una banda, els animals IRS-1^{+/-} en dieta alta en lípids i, per altra banda, els animals IRS-1^{-/-}. Així doncs, l'expressió de GK en múscul esquelètic podria resultar una bona aproximació terapèutica en la diabetis de tipus 2, tot i que és necessària la realització de més estudis en models animals de la malaltia.

Així, els resultats obtinguts en aquest treball indiquen que l'expressió de l'enzim GK en múscul esquelètic podria resultar una bona aproximació per contrarestar la hiperglucèmia en la diabetis de tipus 1 i per millorar la sensibilitat a la insulina en la diabetis de tipus 2. Les característiques del múscul esquelètic i la seva fàcil accessibilitat fan que actualment s'estiguin estudiant un gran nombre de teràpies centrades en la manipulació genètica d'aquest teixit. No obstant, és necessària la realització de més estudis de transferència genètica *in vivo*, utilitzant vectors virals o no virals, en múscul esquelètic de models de diabetis de tipus 1 i models de diabetis de tipus 2. Això permetria determinar l'eficàcia, els efectes a llarg termini i altres aspectes que és molt important conèixer abans de què qualsevol aproximació de teràpia genètica pugui ser aplicada a pacients humans.

V. CONCLUSIONS

1. S'han obtingut ratolins transgènics que han incorporat en el seu genoma i expressen el gen del transportador GLUT2 sota el control del promotor de la cadena lleugera de la miosina. Aquests animals són viables i tenen una vida reproductiva normal.
2. L'expressió de GLUT2 en el múscul esquelètic de ratolins transgènics incrementa la captació de glucosa per aquest teixit i millora la tolerància al sucre.
3. S'han obtingut ratolins dobles transgènics que expressen a múscul esquelètic el transportador GLUT2 i l'enzim glucoquinasa sota el control del promotor de la cadena lleugera de la miosina.
4. Els animals dobles transgènics presenten una millora en la sensibilitat a la insulina i una disminució de la hiperglucèmia diabètica després del tractament amb estreptozotocina. No obstant, no s'observaven diferències respecte els animals que expressen únicament glucoquinasa. Per tant, l'expressió de GLUT2 en múscul esquelètic no millorava l'efecte de la glucoquinasa sobre la captació de glucosa.
5. S'han obtingut mioblasts C₂C₁₂ en cultiu que expressen l'enzim glucoquinasa. Aquestes cèl.lules presentaven un increment en la captació de glucosa, la producció de lactat i l'acumulació de glucogen.
6. Els miotubs C₂C₁₂GK eren capaços de prevenir i també revertir l'hiperglucèmia diabètica quan eren transplantats a la cavitat peritoneal de ratolins singènics C3H.
7. També, s'ha caracteritzat un model animal de resistència a la insulina que combina una alteració genètica, la genosupressió d'un al·lel de l'IRS-1, amb l'efecte diabetogènic d'una dieta alta en lípids. Aquests ratolins desenvolupen una gran hiperinsulinèmia i presenten una marcada resistència a la insulina.
8. L'expressió de glucoquinasa en múscul esquelètic de ratolins genosuprimits heterozigots per IRS-1 i alimentats amb una dieta alta en lípids millora la sensibilitat a la insulina i la tolerància a la glucosa d'aquests animals. A més, l'expressió de l'enzim prevé l'aparició d'obesitat i contraresta la resistència a la insulina i la intolerància a la glucosa en animals controls en dieta alta en lípids.

9. S'ha electrotransferit *in vivo* del gen de la glucoquinasa als músculs *tibialis anterior*, *quadriceps* i *gastrocnemius* de ratolins amb una supressió total del substrat del receptor de la insulina (IRS-1^{-/-}), un model de resistència a la insulina sense obesitat.

10. L'expressió de la glucoquinasa en aquests animals portava a un increment en la captació de la glucosa, i a una millora en la resistència a la insulina.

11. Tots aquests resultats suggereixen que l'expressió de glucoquinasa en múscul esquelètic podria resultar una bona estratègia per a contrarestar la hiperglucèmia en la diabetis de tipus 1 i millorar la sensibilitat a la insulina en la de tipus 2.

VI. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS.

1.1. ANIMALS.

Els animals utilitzats per a la tècnica d'obtenció d'animals transgènics eren ratolins híbrids B6SJL, que provenien de l'encreuament de les soques C57BL/6 i SJL (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA), com a femelles donadores d'embrions i CD-1 (Charles River) com a femelles receptores. Els mascles que es varen vasectomitzar eren OF-1 (IFFA CREDO). Els ratolins genosuprimits en IRS-1 provenien del laboratori del doctor Ronald Kahn (Joslin Diabetes Center and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA). Els animals dobles transgènics es van obtenir a partir de l'encreuament de colònies de ratolins prèviament establertes i caracteritzades en el nostre laboratori. Concretament, els ratolins dobles transgènics MLC/GLUT2+GK s'obtingueren a partir dels ratolins transgènics que expressaven el cDNA de la glucoquinasa a múscul esquelètic sota el control del promotor de la cadena lleugera de la miosina (MLC) (Otaegui et al., 2000) i dels ratolins transgènics MLC/GLUT2 caracteritzats en aquest estudi.

Tots els animals, tant controls com transgènics, es trobaven en condicions de temperatura i llum controlades (cicles de 12 hores de llum i 12 hores de foscor) i eren alimentats de forma rutinària amb una dieta estàndard de laboratori (Panlab MR, Barcelona). Els animals van ser utilitzats d'acord amb la legislació vigent i amb l'aprovació del Comitè d'Ètica i d'Experimentació Animal i Humana de la UAB.

1.2. LÍNIES CEL·LULARS.

La línia cel·lular emprada va ser la línia C₂C₁₂ de mioblasts de ratolí. El medi utilitzat per al creixement d'aquestes cèl·lules va ser el DMEM (GIBCO-BRL) amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS, GIBCO-BRL).

1.3. SOQUES BACTERIANES I VECTORS PLASMÍDICS.

La soca bacteriana utilitzada com a portadora de les diferents construccions plasmídiques va ser la DH5alfa d'*E. coli*. El creixement d'aquestes cèl·lules es va realitzar a 37° C en

medi LB, amb una concentració de 50 mg/ml d'ampicil.lina per a la selecció dels plàsmidis. Es van conservar glicerinars a -80° C en medi LB amb glicerol al 20% (vol/vol).

Els vectors plasmídics emprats en aquest estudi van ser el pMDAF2, pGEM-GLUT2, pMLC/GLUT2, pMLC/GK, pPGK/neo, pTG6600-GK, pCMV-βgal, pBS-18ScDNA.

1.4. REACTIUS I MEDIS DE CULTIU.

Els reactius de biologia molecular es van obtenir de les cases comercials Roche Diagnostics GmbH (Germany), Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EEUU), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU), Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU), Sigma (St. Louis, MO, EEUU), Pharmacia-LKB (Uppsala, Suècia), Quiagen GmbH (Hilden, Germany), Schleicher & Schuell (Keene, New Hampshire), CIS Biointernational (Gif-Sur-Yvette, France), Crystal chem Inc. (Chicago, USA), Wako Chemicals (Neus, Germany) i Proligo Biochemie GmbH (Hamburg, Germany). Els productes marcats radioactivament (dCTP, 2-deoxiglucosa, glucosa U-[C14]) s'adquireixen a Amersham Biosciences. L'estreptozotocina (ref S-0130) utilitzada per induir diabetis experimental es va adquirir a la casa Sigma. Els medis de cultiu de les línies cel.lulars, el sèrum fetal boví, el sèrum de cavall, la tripsina i la barreja de penicil.lina/estreptomycina eren de GIBCO-BRL.

1.5. SONDDES.

Les diferents sondes utilitzades pels Southern blots i Northern blots van ser les següents: en el cas del GLUT2 corresponia a un fragment de 1.4 kb EcoRI-EcoRI del cDNA del gen (cedit pel Dr. G. Bell, University of Chicago, Chicago, Ill); en el cas de la GK corresponia a un fragment de 2.3 Kb EcoRI-EcoRI del cDNA de la GK de rata (cedit pel Dr. P. Iynedjian, University of Geneva, Geneva, Switzerland); la sonda de GLUT1 corresponia al fragment HindIII-HindIII de 1.8 Kb del cDNA de GLUT1 (cedit pel Dr. M. Birnbaum, Harvard University, Boston, MA); la sonda de la miogenina corresponia al fragment de 1.1 Kb EcoRI-EcoRI del cDNA; la sonda de la B-actina corresponia al fragment de 1.3 Kb EcoRI-EcoRI del cDNA de conill ; i la sonda del 18s corresponia a un fragment de 5.7 Kb EcoRI-EcoRI del cDNA humà (cedit pel Dr. Gamboa).

1.6. OLIGONUCLEÒTIDS.

Els oligonucleòtids utilitzats per a la realització de la PCR del GLUT2 es van demanar a Proligo Biochemie GmbH. Les seqüències dels encebadors utilitzats són les següents:

Primer MLC: 5'-GTC AAG CGA GCC ACC ACT GC -3'

Primer GLUT2: 5'- TCA GTG CCA CTA GAA TAG GCT G -3'

1.7. ANTICOSSOS.

Els diferents anticossos utilitzats pels Western blots van ser els següents :

- anticòs policlonal de conill contra la proteïna GLUT2 d'humà (Alpha Diagnostic International, Cat. GT22-A, hGLUT2 antibody).
- anticòs de conill contra la proteïna de membrana GLUT-4 (cedit pel Dr. Zorzano).
- anticòs secundari de porc contra IgG de conill conjugat a peroxidasa - DAKO, Pig anti Rabbit Immunoglobulins HRP, Ref. P0217.
- anticòs secundari anti-rabbit biotinitat, de Sigma.
- anticòs anti-fal.loïdina conjugat a rodamina, de Sigma.

2. MÈTODES.

2.1. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE DNA.

2.1.1. Preparació de DNA plasmídic.

Per a l'obtenció de petites quantitats de DNA plasmídic es realitzen minipreparacions segons el protocol de lisi alcalina descrit originalment per Birnboim i Doly (1979). El plasmidi així obtingut (uns 3-4 µg/ml de medi de cultiu) es troba principalment en forma circular, tancada covalentment (*supercoiled*) i, en general, és susceptible de ser sotmès a manipulacions enzimàtiques sense necessitat de més purificacions.

El mètode consisteix en una degradació de la paret bacteriana per l'acció de la lisozima, seguida d'una lisi alcalina de l'esferoplast i una precipitació selectiva del DNA genòmic bacterià i de proteïnes desnaturalitzades per acció d'una solució concentrada d'acetat

potàssic a pH àcid. El DNA plasmídic es purifica després mitjançant precipitació amb isopropanol i rentat amb etanol al 75%. L' RNA bacterià és degradat amb RNasa A.

Solució de lisozima

Tris- HCl pH 8	25 mM
EDTA	10 mM
Glucosa	50 mM
Lisozima	5 mg/ml

Solució de lisi

NaOH	0.2 M
SDS	1%

Solució d'acetat potàssic pH 4.8

Acetat potàssic	3 M
Àcid acètic glacial	2 M

L'obtenció de grans quantitats de DNA es realitza mitjançant maxipreparacions de DNA, a partir de 250-500 ml de medi de cultiu. El mètode es basa igualment en una lisi alcalina, però la purificació del DNA es realitza amb columnes de Qiagen^{MR}.

Per a l'obtenció del DNA utilitzat en l'electrotransferència, lliure d'endotoxines, es parteix de 1-1.5 litres de medi de cultiu i es purifica pel mètode de lisi alcalina seguint el protocol de MEGAPREP Endotoxin-free de la casa Qiagen^{MR}. Aquest protocol permet l'obtenció de fins a 2.5 mg de DNA plasmídic lliure d'endotoxines, la qual cosa millora l'eficiència de transfecció en cèl.lules eucariotes.

2.1.2. 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 unitats d'enzim per microgram de DNA, tenint present de no superar el 5% de glicerol al tampó de restricció. El temps de digestió del DNA plasmídic oscil.la entre 1-2 h, mentre que quan es tracta de

DNA genòmic es deixa digerint durant tota la nit. Els productes de la restricció són analitzats en gels d'agarosa/TAE.

2.1.3. Aïllament i purificació de fragments de DNA.

2.1.3.1. Gels d'agarosa.

L'electroforesi en gels d'agarosa és una tècnica útil per a la separació analítica o preparativa de fragments de DNA de mida superior a 100 pb. La visualització dels fragments de DNA (prèvia digestió amb enzims de restricció), s'aconsegueix mitjançant la incorporació en el gen del colorant fluorescent bromur d'etidi (0.5 micrograms/ml) que s'intercala entre les cadenes de DNA i apareix com una banda de color taronja quan és sotmès a il.luminació ultravioleta (300 nm). Aquesta tècnica permet detectar quantitats de fins a 5 ng de DNA.

En el present estudi s'utilitzen gels d'agarosa en tampó TAE, de concentracions d'agarosa de l'1%. Per a determinar la mida de les diferents bandes de DNA es fan servir els marcadors de pes molecular 1Kb DNA ladder (Invitrogen) i Marker X (Roche).

Tampó d'electroforesi (TAE 1x)

Tris-acetat pH 8.3	40 mM
EDTA	1 mM

Tampó de càrrega 10x

Glicerol	50% (vol/vol)
EDTA	100 mM
SDS	1% (vol/vol)
Blau de bromofenol	0.1% (p/vol)

2.1.3.2. Purificació de fragments de DNA per GeneClean.

Gene Clean[®] és un mètode ràpid per a la purificació de fragments de DNA en gels d'agarosa. Està basat en la dissolució del fragment d'agarosa que conté la banda desitjada en un agent caotrópic, en aquest cas en una solució saturada de NaI. Aquestes condicions permeten una adsorció selectiva del DNA a una matriu de sílice. El DNA posteriorment es renta i s'elueix en condicions de baixa força iònica. En aquest cas es va fer servir el kit comercial de Qiagen GENE CLEAN II[®] Kit i es va seguir el protocol dels subministradors.

2.1.3.3. Purificació de fragments de DNA per electroelució.

Aquesta tècnica es fa servir a l'hora de purificar el fragment de DNA que s'ha de microinjectar, ja que extreu el DNA de forma molt neta sense deixar cap residu que posteriorment pugui ser tòxic per a l'embrió. El DNA es va aïllar seguint les instruccions del kit comercial BIOTRAP BT 1000 (Schleicher & Schull, Dassel, Alemanya).

2.1.4. Construcció de molècules híbrides de DNA.

Amb l'objecte de construir molècules híbrides de DNA, els fragments de DNA són purificats, combinats i tractats amb DNA lligasa del bacteriòfag T4 subministrada per Pharmacia (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suècia). Els productes de la barreja de lligació són introduïts en cèl.lules competents DH5 α d' *E. coli* i aquelles cèl.lules que han adquirit el DNA plasmídic es seleccionen mitjançant l'addició de l'antibiòtic adequat, confirmant posteriorment per anàlisi del DNA l'obtenció de la molècula híbrida.

2.1.4.1. Subclonatge de fragments de DNA.

Les tècniques de subclonatge (digestió del DNA amb enzims de restricció, lligacions dels diferents fragments de DNA, etc) són àmpliament utilitzades amb diferents finalitats. En aquest treball les hem utilitzat per tal de construir el gen quimèric MLC/GLUT2.

2.1.4.2. Transformació de cèl.lules d'*E. coli*.

Les cèl.lules DH5 α d'*E. coli* utilitzades es fan competents mitjançant el mètode de Hanahan (1985), que emprava el MgCl₂ i el CaCl₂ com a agents permeabilitzadors de membrana, procedint-se a continuació a la transformació amb els plasmidis desitjats. En aquest mètode s'incuben les cèl.lules competents amb el DNA plasmídic durant uns 10 minuts en gel; posteriorment s'incuben 45 segons a 42° C i es deixen 5 minuts en gel. S'afegeixen 200 microlitres de LB i es deixa en agitació a 37° C durant uns 40 minuts. Seguidament, s'extenen en placa sobre un medi selectiu (que en el nostre cas és el medi de cultiu LB) que conté 50 micrograms/ml d'ampicil.lina. D'aquells clons que resulten resistents i, per tant, positius, es procedeix a fer-ne un creixement en medi LB/ampicil.lina en volums de 3 a 5 ml per tal d'amplificar-los i procedir a la seva anàlisi.

LB (Luria-Bertrani Broth)

Triptona	10 g/l
Extracte de llevat	5 g/l
NaCl	5 g/l

2.1.5. Marcatge radioactiu del DNA.

El mètode radioactiu emprat per al marcatge de sondes, utilitzades tant per Northern com per Southern blot, fou, a l'inici de l'estudi, el preparat comercial *Random Primed Labelling Kit* (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanya), i se seguiren les indicacions del protocol de la casa comercial. Posteriorment es va passar a utilitzar el preparat comercial "Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)" (ref. 27-2940-01, Amersham Biosciences) seguint les instruccions del fabricant. Es parteix aproximadament de 50 ng de sonda de DNA i s'incuba a 37° C durant 1-2 hores amb una mescla de dATP, dGTP, dTTP i 32P-dCTP en presència del fragment Klenow de la DNA polimerasa I d'*E. coli*. Aquesta tècnica (Feinberg i Vogelstein, 1983), permet la síntesi de sondes de DNA d'alta radioactivitat específica (1.8×10^9 dpm/mg) i amb un marcatge uniforme. La separació dels nucleòtids no incorporats s'aconsegueix mitjançant gel filtració en columnes de Sephadex G-50 (Probe Quant G-50 Miro Columns, Amersham Pharmacia Biotech).

2.2. TÈCNICA D'OBTENCIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS.

La tècnica utilitzada per a l'obtenció de ratolins transgènics fou la microinjecció de DNA en el pronucli masculí d'oòcits fecundats de ratolí (Hogan et al., 1986; Yun i Wagner, 1989).

2.2.1. Preparació del DNA.

La puresa del DNA a microinjectar és un factor molt important per a l'èxit de la microinjecció. El plasmidi que conté el gen d'interès es prepara amb columnes de Qiagen. Posteriorment el DNA es digereix amb els enzims de restricció apropiats i es sotmet a electroforesi en gel d'agarosa/TAE. El fragment de DNA desitjat s'aïlla i es purifica per electroelució. Finalment, es redissol en el tampó de microinjecció de Brinster.

Tampó de Brinster pH 7.5

Tris-HCl	10 mM
EDTA	0.25 mM

La determinació de la concentració de la solució de DNA per microinjectar s'efectua per comparació en gel d'agarosa amb un marcador de pes molecular conegut. Les concentracions per microinjectar són de 2 i de 4 ng/microlitre (Brinster et al., 1985). Abans de ser utilitzat, aquest DNA es centrifuga 10 min a 13000 xg a fi d'evitar la presència de partícules que podrien obturar la pipeta de microinjecció.

2.2.2. Recol.lecció dels oòcits fecundats.

La tècnica de microinjecció s'inicia amb la superovulació de les ratolins femelles donadores, la recol.lecció dels oòcits fecundats, la selecció d'aquests per al seu posterior ús i la sincronització de les femelles receptores mitjançant la inducció de la pseudogestació.

Amb la finalitat d'augmentar el nombre d'òvuls recol.lectats, les femelles donadores B6SJLF₁ són sotmeses a un procés de superovulació a través de l'administració d'hormones, de manera sincronitzada amb cicles de llum i fosc (Rugh, 1986). El protocol es basa en la injecció intraperitoneal de 5 UI de PMSG, seguida 48 h més tard de l'administració de HCG. Posteriorment les femelles s'encreuen amb mascles de la mateixa soca. L'ovulació es produeix 60 h després de l'inici del tractament.

L'obtenció de femelles receptores en estat de pseudogestació es realitza encreuant femelles CD-1, escollides pel seu bon caràcter maternal, amb mascles OF-1 vasectomitzats. Degut a que els ratolins són animals d'ovulació induïda, la sincronització del seu estat de pseudogestació respecte les femelles donadores es realitza encreuant-les amb els mascles al mateix temps que les donadores.

Per saber quines femelles han estat cobertes, el dia següent se seleccionen aquelles que presenten tap vaginal i se sacrifiquen. Se n'extreuen els oviductes i se n'alliberen els òvuls fecundats en un medi de Brinster (Brinster, 1982) amb hialuronidasa (1mg/ml). Posteriorment, són rentats amb medi sense enzim, procés que es repeteix diferents

vegades. Finalment, són transferits amb gotes del mateix medi submergides en oli de parafina. Així es mantenen entre una i dues hores a 37° C i sota una atmòsfera amb una mescla de gasos (5% de O₂, 5% de CO₂ , i 90 % de N₂). El nombre d'òvuls recol·lectats varia de 20 a 25 per femella.

	<u>Medi Brinster-bicarbonat</u>	<u>Medi Brinster-HEPES</u>
NaCl	94.5 mM	94.5 mM
KCl	4.78 mM	4.78 mM
CaCl ₂ x2H ₂ O	1.71 mM	1.71 mM
KH ₂ PO ₄	1.19 mM	1.19 mM
MgSO ₄ x7H ₂ O	25 mM	-----
HEPES	-----	20.8 mM
Lactat sòdic	23.3 mM	23.3 mM
Piruvat sòdic	0.33 mM	0.33 mM
EDTA	0.1 mM	0.1 mM
Glucosa	5.56 mM	5.56 mM
BSA	5 g/l	5 g/l
Penicil.lina G	100 U/ml	100 U/ml
Estreptomicina	50 mg/ml	50 mg/ml
Roig fenol	1%	1%

2.2.3. Preparació per a la microinjecció.

Per obtenir un bon èxit en la microinjecció són molt importants les micropipetes. Aquestes es preparen a partir d'uns capil.lars de vidre tipus Garner d'1 mm de diàmetre que prèviament han estat siliconitzats. Aquests capil.lars s'estiren amb un estirador de pipetes. A continuació, amb la microforja, es dona un angle d'aproximadament 15° a la punta de les pipetes mitjançant la col.locació vertical d'aquestes a prop de la font de calor de la microforja durant uns breus segons. Aquest procediment és necessari perquè les pipetes se situin en el mateix pla del microscopi que els embrions i d'aquesta forma poder enfocar la porció de la pipeta que entra en el camp de visió. Després, la pipeta de subjecció és tallada en la microforja, col.locant-la horitzontalment sobre un llit de vidre unit al filament de la microforja. Amb això s'aconsegueix un trencament de la pipeta de forma que els cantells queden de tipus rom. L'obertura de la pipeta de microinjecció s'obté trencant la seva punta tancada sobre de la pipeta de subjecció.

El portaobjectes utilitzat és una modificació del portaobjectes estàndard de microscopia òptica, ja que se li ha practicat un orifici d'una àrea rectangular de 2 x 1.6 cm. Sota aquesta àrea s'hi col.loca un cobreobjectes, segellant amb parafina. Aquest tipus de

cambrà és òptima per a la microinjecció d'embrions. Una gota (4 microlitres) del medi de microinjecció de Brinster-HEPES i una gota de DNA (2 ng/microlitre dissolts en tampó de microinjecció) són dipositades verticalment en el centre del portaobjectes de microinjecció. Les dues gotes es cobreixen amb oli de silicona. A continuació uns 25 embrions són transferits a la gota de medi Brinster.

2.2.4. Microinjecció dels oòcits fecundats.

Immediatament abans de la injecció, la pipeta de microinjecció s'omple amb oli de silicona i s'instal·la en el suport del micromanipulador corresponent. La pipeta de subjecció es col·loca en l'altre micromanipulador i s'omple amb oli de parafina gràcies a l'aplicació de pressió sobre la xeringa tipus Hamilton. Ambdues pipetes són orientades amb l'angle correcte i s'enfoquen les dues puntes a través del microscopi, assegurant-se que les dues queden alineades horitzontalment.

La microinjecció es realitza a uns 200 augments en la gota de medi on es troben els zigots. La pipeta de microinjecció s'omple de la solució de DNA i la pipeta de subjecció, després d'haver-se omplert amb una mica de medi, s'utilitza per col·locar i fixar els zigots amb el pronucli maculí accessible a la pipeta d'injecció.

Per microinjectar la solució de DNA s'enfoca la membrana del pronucli masculí i la punta de la pipeta de microinjecció i s'introdueix aquesta a la membrana pronuclear, injectant-se uns 2 pl de solució de DNA (s'observa un augment de la mida del pronucli). Sols es guarden per a la transferència els que estan en bones condicions després de la injecció. Es mantenen en una placa de cultiu per a embrions a temperatura fisiològica fins a ser transferits a la femella receptora.

2.2.5. Transferència a la femella receptora.

Per fer la transferència es necessiten dos tipus de pipetes; unes més gruixudes (200 a 400 micròmetres) que serveixen per transportar els embrions d'unes gotes a les altres, i les més primes (120 a 150 micròmetres), que s'utilitzen per transportar els zigots fins a l'oviducte de la femella receptora.

Com a receptores s'utilitzen femelles CD-1, d'una edat mínima de 6 setmanes, a les quals se'ls ha induït un estat de pseudogestació. Les femelles cobertes per mascles vasectomitzats que presentven tap vaginal són separades. La transferència dels embrions es fa sota l'efecte anestèsic de 0.8-0.9 ml d'Avertin intraperitoneal (1 g de tribromoetanol i 0.6 ml d'alcohol amílic terciari dissolts en 50 ml de solució salina fisiològica). Després de depilar una àrea aproximada de 1.5 x 1.5 cm a l'alçada de la zona lumbar i d'esterilitzar la zona amb alcohol, es practica una incisió longitudinal d'1 cm. Un cop localitzats els ovaris, s'incideix sobre la massa muscular i s'extreu la massa ovàrica.

Un cop es té la massa ovàrica fora de la cavitat abdominal i orientada correctament, s'esquinça la bossa ovàrica i es visualitza l'infundíbul. Amb l'ajut de la pipeta fina de transferència s'introdueixen 10-12 oòcits microinjectats a l'interior de l'infundíbul. Posteriorment es retorna la massa ovàrica dins de la cavitat abdominal. El procés es repeteix en l'altre costat. Finalment la incisió realitzada en la pell és tancada amb grapes. Les femelles duen a terme una gestació normal d'uns 20 dies. Durant les tres setmanes després del part es mantenen sota control per vigilar que no hi hagi problemes com, per exemple, el rebuig de les cries.

2.3. DETECCIÓ DELS ANIMALS TRANSGÈNICS.

2.3.1. Obtenció de DNA genòmic.

La detecció dels animals transgènics es realitza mitjançant Southern blot o PCR. En ambdós casos es parteix de DNA obtingut de la digestió de fragments de cua dels ratolins (mètode de De Wet et al., 1987). Aquest mètode consisteix en l'obtenció d'un homogenat de cua de ratolí en una solució de lisi tamponada que conté proteïnasa K i SDS, incubant a 56° C durant la nit. Aquesta digestió permet l'alliberació del DNA al medi, que posteriorment es purifica mitjançant una precipitació per salinitat i isopropanol, es renta amb etanol 75% i es resuspén finalment en aigua o TE.

Així, s'addicionen 700 µl de tampó de lisi amb proteïnasa K (dilució 1/100 de la solució stock de proteïnasa K en tampó de lisi) a un tub que conté un tros de cua de ratolí, i s'agita amb el Vòrtex. Aquesta solució s'incuba durant 14-16 h a 56° C. Posteriorment s'hi afegeixen 250 µl de NaCl saturat i es barreja per tal d'homogenitzar les mostres. Es centrifuga durant 10 minuts a velocitat màxima i es transfereix el sobrenedant a un nou

tub eppendorf que conté 500 µl d'isopropanol. Aquest tub s'agita per inversió per tal de precipitar el DNA i es centrifuga a 12000 r.p.m. durant 10 minuts a temperatura ambient. S'obté un sediment de DNA que es renta amb etanol al 70% i es resuspén en 40-60 µl d'aigua estèril (o alternativament amb una solució tampó TE pH 7.5).

Solució de llisi

Tris-HCl pH 8.5	100 mM
EDTA pH 8	5 mM
SDS	0.2% (p/vol)
NaCl	200 mM

Proteinasa K

10 mg/ml. Guardar al congelador a -20° C.

TE

Tris-HCl pH8	10 mM
EDTA pH8	1 mM

Aigua estèril

Ajustar el pH a 7.5

2.3.2. Anàlisi de DNA per Southern blot.

Per determinar la presència del gen quimèric en ratolins transgènics es va utilitzar la tècnica de Southern blot. En el cas dels transgènics MLC/GLUT2, 10 micrògrams de DNA genòmic són digerits amb l'enzim *Hind* III durant tota la nit. El dia següent es realitza una electroforesi en gels del 1% d'agarosa /TAE, que es deixa córrer unes 4-5 hores entre 40-60 V. Posteriorment es realitza el tractament del gel, que consisteix en: 15 minuts en una solució HCl 0.25 N, per tal d'aconseguir la despurinització i assegurar la transferència de les bandes d'elevat pes molecular; 15 minuts en una solució alcalina (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) per tal de desnaturalitzar el DNA i facilitar-ne també la transferència; i un mínim de 15 minuts en una solució neutralitzant (1 M Tris, 3 M NaCl), que permet neutralitzar el pH i carregar negativament de nou el DNA.

Posteriorment es realitza la transferència del DNA per mitjà del sistema Turboblottter (Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire) a membranes de niló carregades positivament (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN - ref. 1 417 240). La transferència

es produeix degut a capil·laritat per pressió negativa en tampó d'alta força iònica (10x SSC) mitjançant papers (GB002 i GB004- Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire). El procés es completa en un mínim de 2 hores, però és habitual també deixar-ho durant tota la nit. Un cop finalitzada la transferència, el filtre és irradiat amb llum ultraviolada d'ona curta per crear unions covalents del DNA al niló mitjançant l'ús d'un UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA).

Un cop tenim el DNA fixat a la membrana, es procedeix a la prehibridació durant unes 2 hores a 65° amb una solució que conté principalment proteïnes, detergents com l'SDS i ssDNA, per tal que s'uneixin i bloquegin la membrana, reduint així la hibridació inespecífica. Posteriorment les membranes són hibridades amb la sonda marcada radioactivament, durant tota la nit. A continuació es renta per eliminar l'excés de sonda i la radioactivitat que es manté a la membrana per unions dèbils. Es fan 3 rentats consecutius: 2 rentats, de 10 min cada un, amb un tampó de baixa astringència, a 30 ° C; i un rentat de 15 min a 65 ° C amb tampó d'alta astringència.

TAE 1x

Tris-acetat 40 mM, pH 8.3

EDTA 1mM

Bromur d'etidi 0.5 ug/ml

20x SSC

NaCl 3M

Citrat sòdic 0.3 M, pH 7.4

Solució de prehibridació i hibridació

Na₂HPO₄ pH 7.2 0.25 mM

SDS 20% (p/vol)

EDTA 1 mM

Blocking reagent (Roche) 0.5% (p/vol)

(ref. 1096176)

Solució de baixa astringència: 2x SSC, 0.1% SDS

Solució d'alta astringència: 0.1x SSC, 0.1% SDS

2.3.3. Establiment de les línies de ratolins transgènics.

Els animals nascuts a partir dels zigots microinjectats són deslletats a les 3 setmanes d'edat i separats per sexes. S'identifiquen per color i orificis a les orelles, i se'ls talla un tros de cua per extreure'n el DNA genòmic.

Els animals detectats com a positius són encreuats amb animals de la mateixa soca híbrida per transmetre el nou caràcter a la descendència. D'aquesta forma es pot establir a partir de cada animal transgènic una colònia d'animals amb els quals es realitzen els estudis que ens havíem proposat.

2.3.4. Anàlisi de DNA per PCR.

Un cop establertes les línies de ratolins transgènics MLC/GLUT2, es va posar a punt la tècnica de PCR per tal de detectar els animals positius obtinguts a partir de nous encreuaments. L'anàlisi de DNA per PCR és un mètode ràpid que permet l'amplificació del transgen si es disposa dels *primers* adequats. Aquest mètode de detecció és especialment sensible a les contaminacions creuades, de forma que s'ha de treballar amb cura, però d'altra banda presenta l'avantatge que permet obtenir els resultats ràpidament, sense necessitat d'utilitzar radioactivitat, amb poc DNA i sense necessitat d'una purificació excessiva d'altres restes cel·lulars. Els *primers* han d'estar dissenyats de forma que amplifiquin una regió específica i exclusiva del transgen, minimitzant la formació d'estructures secundàries i dímers, i que permetin diferenciar la zona amplificada del transgen de la zona amplificada del gen endogen.

Aproximadament 50 ng del DNA genòmic aïllat s'utilitzen per amplificar el transgen amb el següent programa de temperatura:

1 minut a 95° C

30 segons a 94° C, 30 segons a 62° C i 1 minut 72° C durant 32 cicles

4 minuts a 72° C

La parella de *primers* utilitzada per amplificar el GLUT2 és:

Primer MLC: 5'- GTC AAG CGA GCC ACC ACT GC -3'

Primer GLUT2: 5'- TCA GTG CCA CTA GAA TAG GCT G -3'

L'amplificació es realitza en un termociclador Perkin-Elmer 9600, seguint les instruccions del proveïdor. El producte amplificat s'analitza en un gel d'agarosa a l'1% i es visualitza per tinció amb bromur d'etidi.

2.4. PREPARACIÓ I ANÀLISI D'RNA.

2.4.1. Extracció de l'RNA total.

La preparació d'RNA total es realitza a partir de teixit congelat en nitrogen líquid i posteriorment mantingut a -80° C, mitjançant l'ús de la solució TriPure[™] Isolation Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Germany), seguint les instruccions del fabricant. Aquest mètode permet l'aïllament de RNA total, DNA i proteïnes a partir de la mateixa mostra en un únic pas de separació.

2.4.2. Electroforesi de RNA en gels desnaturalitzants d'agarosa/formaldehid.

Aquests tipus de gels són utilitzats per al fraccionament de l'RNA en experiments de Northern blot, ja que el formaldehid a concentració 2.2 M actua desnaturalitzant les estructures secundàries de l'RNA. Aquest fet permet que la migració de l'RNA sigui proporcional al logaritme del seu pes molecular i possibilita el càlcul de la mida molecular dels diferents missatgers específics. Els tampons d'electroforesi i càrrega, que es descriuen a continuació, han de ser preparats en condicions lliures de contaminació amb ribonucleases per evitar la degradació enzimàtica del RNA.

<u>Tampó electroforesi</u>	<u>Gel agarosa</u>	<u>Tampó de càrrega</u>
MOPS 0.2M	Agarosa 1%	Formamida desionitzada
Acetat Na 50mM	MOPS 10X	MOPS/EDTA 10X
EDTA 10 mM	H2O Estèril	Formaldehid
<i>Ajustat a pH7 amb NaOH 10N</i>	Formaldehid 37%	H2O estèril
<i>Filtrat amb un filtre de 0.2um</i>		Glicerol
		Blau de bromofenol
		<i>Homogenitzat i filtrat amb un filtre de 0.2 um</i>

2.4.3. Anàlisi de RNA per Northern blot

Aquesta tècnica consisteix en la hibridació d'una sonda de DNA o RNA marcada radioactivament amb RNA fraccionat en un gel desnaturalitzant d'agarosa i fixat en un filtre de niló.

La transferència de RNA a la membrana és bàsicament similar a la descrita pel cas del Southern blot, amb l'excepció que el RNA no és mai despurinitzat ni desnaturalitzat. En aquest cas, les transferències es realitzen sense tractament previ del gel per capilaritat amb TurboBlotter (Schleicher & Schuell). Després, el filtre és irradiat amb llum ultravioleta d'ona curta per crear unions covalents del RNA amb el nylon utilitzant el Stratalinker 1800. El protocol per a la prehibridació, hibridació i rentats és el recomanat per la firma fabricant de les membranes de nylon: Nylon Membranes, positively Charged (Roche Diagnostics GmbH, Germany).

2.5. PREPARACIÓ I ANÀLISI DE PROTEÏNA.

2.5.1. Extracció de proteïna total.

L'obtenció de proteïnes totals es realitza politronant els fragments de teixit (aproximadament 100 mg) en 1 ml de tampó d'homogenització. Aquest tampó conté l'inhibidor de proteases Complete, Mini, EDTA-free (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Cat. N° 1836170, de Roche Diagnostics GmbH Germany). Posteriorment l'extracte es deixa en agitació a 4° C durant 1-2h. i finalment es centrifuga 20 min a 13000 rpm. El sobrenedant es reparteix en alíquotes que es guarden congelades, després de mesurar-hi la concentració de proteïna pel mètode de Bradford.

Tampó d'homogenització (mantenir en gel)

Tris-HCl pH 7.5	50 mM
Sacarosa	240 mM
EGTA	1 mM
EDTA	1 mM
NaF	50 mM
Na-β-glicerofosfat	10 mM
Tampó fosfat	5 mM

Tampó fosfat 0.5 M pH 7

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.5 M
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.5 M
<i>Afegir NaH₂ PO₄ sobre Na₂HPO₄ fins arribar a pH 7</i>	

Triton X-100 1%

Filtrat amb un filtre de 0.22 µm

Afegir una pastilla d'inhibidor de proteases per cada 10 ml abans de fer servir

2.5.2. Obtenció de membranes totals.

El protocol per obtenir preparacions de membranes totals a partir de teixits de ratolí es basa en l'homogeneïtzació en un tampó que conté diferents inhibidors de proteases (aprotinina, leupeptina, benzamidina i PMSF). Amb un politró, s'homogeneïtzen 0.3-1 g de teixit en 8 ml de tampó. S'empren tubs de tipus "COREX" (30 ml), fent servir l'aparell a 3-4 unitats de la seva escala de velocitat durant cicles de 30 segons. Posteriorment es centrifuguen els homogenats 20 minuts a 15000xg, es descarten els precipitats i es transfereixen els sobrenedants a un nou tub d'ultracentrífuga per tal de solubilitzar les miofibril·les musculars. Per fer això, s'enrasa el sobrenedant a 8 ml amb tampó d'homogeneïtzació i s'hi afegeixen 2 ml de KCl 4M. Posteriorment s'incuba durant 30 minuts a 4° C amb un agitador orbital i es centrifuga a 200.000xg durant 1 h i 30 minuts a 4° C. Els precipitats obtinguts es resuspenen amb tampó Hepes, mantenint els tubs en gel. Es comença resuspenent amb una pipeta P200, es continua amb una xeringa a la qual s'ha substituït l'agulla per una punta de pipeta p200 aixafada i, finalment, s'utilitza una agulla de 25 G. Es fan alíquotes de la suspensió i es conserva a – 20 fins el moment de la seva anàlisi.

Tampó d'homogenització (pH 7.4) (Preparat abans d'utilitzar-lo i mantingut en gel)

Hepes	25 mM
Sacarosa	250 mM
EDTA	4 mM
Benzamidina	25 mM
Leupeptina	1µM
Aprotinina	1 U/ml
PMSF	0.2 mM

Tampó Hepes (pH 7.4)

Hepes	30 mM
-------	-------

2.5.3. Determinació de la concentració de proteïnes.

L'anàlisi de la concentració de proteïnes es realitza utilitzant el mètode de Bradford, basat en el canvi de color del blau brillant de commassie quan es complexa a les proteïnes, i que canvia el màxim d'absorbància d'aquest cromòfor de 465 nm a 595 nm (quan està lligat a proteïna).

Es prepara una recta patró a partir d'una solució stock d'albúmina sèrica bovina (BSA 1 mg/ml), normalment entre 0 i 20 µg de BSA per cubeta d'espectre d'un sol ús. En paral·lel, es dipositen les dilucions adequades de les mostres en altres cubetes. S'hi afegeixen 200 µl de Reactiu de Bradford (BioRad Protein Assay, ref: 500-0006), s'agita per inversió i es deixa reaccionar durant 5-10 minuts. Passat aquest temps, es llegeix l'absorbància a 595 nm i s'obté la quantitat de proteïna de les mostres per interpolació a la recta patró.

2.5.4. Separació de proteïnes per electroforesi SDS-PAGE.

L'anàlisi de proteïnes es realitza mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida al 10% en presència de SDS (Laemli, 1970). Les mostres són barrejades amb 1/2 volum de tampó de càrrega i s'escalfen a 95° C durant 5minuts. Les electroforesis es realitzen a 45 mA quan les mostres són al gel compilador i a 60 mA quan entren al gel separador. S'utilitzen marcadors de pes molecular pretenyits de Sigma.

Tampó d'electroforesi pH 8.3

Tris Base	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1% (pes/vol)

Tampó de càrrega Laemmli 2x

Tampó fosfat	20 mM
Glicerol	20%
SDS	4%
2-β- mercaptoetanol	2%
Blau de bromofenol	0.2%

2.5.5. Electrotransferència de proteïnes a membrana i immunodetecció.

L'electrotransferència de les proteïnes del gel a membranes Immobilon-P (Millipore) es realitza amb un aparell Transblot model 2051 (LKB) a 250 mA durant 2 h en tampó d'electrotransferència.

Tampó d'electrotransferència

Tris	25 mM
Glicina	150 mM
Metanol	20% (vol/vol)

La immunodetecció es realitza mitjançant el marcatge no radioactiu dels anticossos amb els kits ECL Western Blotting analysis system (Amersham) o Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce), seguint els protocols indicats pel fabricant.

2. 6. ANALÍSI IMMUNOHISTOQUÍMICA.

La immunohistoquímica es realitza sobre talls transversals de teixit muscular fets al criòstat. Per a la detecció immunohistoquímica de GLUT2, aquests talls s'incuben, primer amb l'anticòs anti-GLUT2 humà a concentració de 10 µg/ml i posteriorment amb un anticòs secundari anti-rabbit biotinitat, de Sigma, a una dilució 1:100. A continuació, es tracten els talls amb Streptavidin Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), a una dilució 1:100. L'actina fibril.lar, que s'utilitza com a control, està marcada amb fal.loïdina unida a rodamina (Sigma), a una concentració 1:100. Els nuclis estan contratenyits amb To-pro-3 (Molecular Probes), dilució 1:100. Cadascuna de les incubacions es realitza a 4^o C durant tota la nit. Finalment, es visualitza el resultat mitjançant microscopia confocal. Les imatges obtingudes corresponen a una secció confocal única.

2.7. DETERMINACIÓ DE LA CAPTACIÓ DE GLUCOSA EN MÚSCUL ESQUELÈTIC.

Per a la determinació del metabolisme de la glucosa *in vivo* en teixit muscular s'utilitza un mètode derivat de la tècnica de Sokoloff *et al.* (1977). Aquest mètode (Ferré *et al.*, 1985) es basa en les propietats bioquímiques de la 2-deoxiglucosa, que és transportada pel mateix transportador que la glucosa i fosforilada per l'hexoquinasa. Tot i això, la 2-deoxiglucosa-6-fosfat formada no pot ser posteriorment metabolitzada, i queda atrapada

als teixits si la seva degradació per glucosa-6-fosfatasa és negligible. En múscul esquelètic la 2-deoxiglucosa i la glucosa són captades pel mateix transportador (Kipnis & Cori, 1959) i per altra banda l'activitat glucosa-6-fosfatasa és molt baixa (Lackner *et al.*, 1984).

L'experiment es duu a terme amb animals alimentats en estat post-absortiu. Per a la determinació de l'índex d'utilització de la glucosa *in vivo* s'injecta per via intravenosa 1 µCi de l'anàleg no metabolitzable de la glucosa, 2-[1-³H]deoxi-D-glucosa (2-DG; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a ratolins alimentats. L'eliminació específica de 2-DG de la circulació es determina segons el mètode de Somogyi (Somogyi M. 1945), a partir de 25 µl de sang extreta per la cua als temps 1, 15 i 30 minuts després de la injecció. Els músculs esquelètics (*gastrocnemius*, *quadriceps* i *tibialis*) són disseccionats als 30 min, després del sacrifici de l'animal. L'índex d'utilització de la glucosa és determinat com la mesura de l'acumulació de compostos marcats radioactivament al múscul esquelètic (Ferré *et al.*, 1985). La quantitat de 2-DG-6-fosfat per mil.ligram de proteïna es divideix per la integral de la relació entre la concentració de 2-DG i la glucosa no marcada calculada. Com que els valors no estan corregits per la "constant de discriminació" de la 2-DG en les vies metabòliques de la glucosa, els resultats són expressats com l'índex d'utilització de la glucosa en picomols per mg de proteïna per minut.

2.8. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES SÈRICS.

Per obtenir sèrum de ratolí, els animals són sacrificats per decapitació i immediatament es recull la sang en tubs que es mantenen en gel. El sèrum s'obté després de deixar coagular la sang durant 30 min a 4° C. El coàgul es separa mitjançant centrifugació a 10.000 rpm a 4° C durant 30 minuts. El sèrum manté congelat a -20° C fins el moment de la determinació dels diferents paràmetres. Per a determinar les concentracions d'insulina, adiponectina i leptina per ELISA, s'extreuen uns 30 µl de sang per la vena de la cua del ratolí i es recullen en tubs microvette®CB300Z (SARSTEDT, Germany). El sèrum s'obté després de centrifugar les mostres de sang a 10.000 rpm durant 30 minuts, i es manté congelat fins el moment de la determinació dels diferents paràmetres.

2.8.1. Determinació de glucosa.

Els nivells de glucosa sèrica es determinen a partir d'una gota de sang d'animals sagnats per la cua mitjançant el sistema Glucometer Elite™ (Bayer).

2.8.2. Determinació d'insulina.

La insulina es determina per radioimmunoassaig (RIA) en el sèrum dels animals, mitjançant els kits INSULIN-CT (CIS Biointernational, Gif-Sur-Yvette Cedex, França). El mètode té un límit de sensibilitat de 30 pM i una variació intraassaig del 6%.

D'altra banda els nivells d'insulina també es determinen per ELISA a partir dels sèrums obtinguts per la cua dels animals, utilitzant el kit "Rat Insulin ELISA kit" fabricat per Crystal Chem Inc. (Chicago, EEUU), el qual presenta una reactivitat creuada del 100% amb la insulina de ratolí.

2.8.3. Determinació de lactat.

Per a la determinació de lactat es realitza el mètode en el qual s'addiciona l'enzim L-lactat deshidrogenasa (LDH) a la mostra per a què transformi el lactat a piruvat, al mateix temps que es produeix la reducció del NAD^+ a NADH.

El mètode descrit es va adaptar per ser utilitzat amb un autoanalitzador tipus COBAS BIO. Així, 25 microlitres de la mostra es barregen amb 25 microlitres de la mostra d'assaig a pH 9 (hidrazina 0.25 M, EDTA 0.15 mM i NAD^+ 18 mM). Es deixa preincubant durant 3 min i posteriorment s'afegeixen 35U/ml de LDH per iniciar la reacció. La hidrazina i el medi alcalí de l'assaig són necessaris per evitar que la reacció es desplaci cap a la formació de lactat, ja que el piruvat que es forma a partir del lactat reacciona amb la hidrazina per formar hidrazona i d'aquesta forma la reacció es converteix en irreversible.

2.8.4. Determinació de triglicèrids.

Els triglicèrids sèrics es determinen mitjançant un mètode enzimàtic basat en la quantificació del cromogen PAP. Aquest cromogen és obtingut a partir de tres reaccions acoblades catalitzades per la glicerol quinasa, la glicerol-3-fosfat oxidasa i la peroxidasa respectivament. Es va utilitzar el kit d'assaig Peridochrom^R Triglicèrids GPO-PAP, adaptat per a l'autoanalitzador COBAS-BIO.

2.8.5. Determinació d'àcids greixosos no esterificats (NEFAs).

La determinació dels àcids greixosos no esterificats en sèrum es duu a terme mitjançant el mètode enzimàtic NEFA C de la casa comercial Wako Chemicals, Neuss, Alemanya, adaptat per a l'autoanalitzador COBAS-BIO. El mètode es basa en la quantificació d'un cromogen obtingut després d'una sèrie de reaccions acoblades catalitzades per l'Acil-CoA sintetasa, l'Acil-CoA oxidasa i la peroxidasa respectivament.

2.8.6. Determinació de β -hidroxibutirat.

Els nivells sèrics de β -hidroxibutirat es determinen a l'analitzador COBAS BIO emprant el mètode colorimètric del kit comercial D-3-Hydroxybutyric acid de Roche Diagnostics, GmbH, Germany.

2.9. DETERMINACIÓ DE METABOLITS.

2.9.1. Determinació de glucogen.

El contingut d'aquest polisacàrid es determina mitjançant la tècnica descrita per Keppler i Decker a l'any 1984, basada en la utilització de l'enzim α -amiloglucosidasa. La glucosa alliberada per aquest enzim es determina espectrofotomètricament en un analitzador COBAS-BIO utilitzant el kit comercial Gluco-Quant^R de Roche Diagnostics.

En primer lloc, s'homogeneïtzen mostres de fetge, prèviament pesades, en 10 volums de HClO₄ al 10%. A continuació es centrifuga a 6000xg durant 5 minuts, i es recull el sobrenedant. S'agafen 400 μ l de l'extracte, se li afegeix indicador universal i s'ajusta a pH 5 amb HClO₄. De cada mostra s'agafen, per una banda, 100 μ l als quals s'afegeix 100 μ l de solució d' α -amiloglucosidasa (10 U/ml en tampó acetat a pH 4.8). Per altra banda, s'agafen 100 μ l més de cada mostra i s'afegeixen 100 μ l de tampó acetat pH 4.8. Aquests dos grups de mostres són incubats durant 2 hores a 50° C i s'aturar la reacció afegint 250 μ l de HClO₄ al 10%. Posteriorment les mostres es centrifuguen durant 10 min a 13000 rpm i es determina la concentració de glucosa al sobrenedant. La quantitat de glucogen es calcula com la diferència obtinguda entre les mostres incubades amb α -amiloglucosidasa i les que no s'han incubat amb l'enzim.

2.10. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA.

Aquest test s'utilitza amb la finalitat de comprovar si els animals són capaços de respondre correctament a una sobrecàrrega de glucosa. Aquells animals que mantenen les glucèmies elevades i no recuperen els nivells basals de glucosa durant el temps de realització del test són considerats animals diabètics.

S'agafen animals controls i transgènics i, després d'un dejuni d'unes 12 hores, se'ls fa un control de glucèmia basal amb una gota de sang obtinguda per la vena de la cua. La mesura de la glucèmia es fa amb el Glucometer Elite™ (Bayer). Posteriorment se'ls injecta intraperitonealment una dosi d'1 o 2 g de glucosa per kg de pes viu. A partir d'aquest moment es fan extraccions de sang seriades amb un interval de 30 min fins a les 3 hores de l'inici del test.

2.11. TEST DE TOLERÀNCIA A LA INSULINA.

El test de tolerància a la insulina és una prova que té com a objectiu comprovar si els animals són capaços de disminuir la concentració de glucosa en sang després d'una administració exògena d'insulina. Abans de l'administració de l'hormona es determina la glucèmia basal als animals controls i transgènics. Posteriorment, s'injecta intraperitonealment una dosi de 0.75 U d'insulina per kg de pes viu. A partir d'aquest moment es realitzen extraccions de sang seriades fins a la finalització de l'experiment.

2.12. INDUCCIÓ DE LA DIABETIS EXPERIMENTAL MITJANÇANT STZ.

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, la qual destrueix.

Per a la inducció de la diabetis experimental, s'administra una injecció intraperitoneal durant cinc dies consecutius, a una dosi de 45 mg de STZ per kg de pes corporal. L'estreptozotocina es dissol en una solució de tampó citrat sòdic 10 mM amb 0.9% NaCl, pH 4.5, immediatament abans de la seva administració.

2.13. DETERMINACIÓ DEL CONSUM D'AIGUA I MENJAR.

La determinació del consum de menjar i aigua es realitza en animals prèviament individualitzats. La quantitat de menjar i aigua consumida s'obté per sustracció de la quantitat final mesurada respecte de la quantitat inicialment addicionada.

2.14. ELECTROTRANSFERÈNCIA DE DNA A MÚSCUL ESQUELÈTIC.

Per a l'electrotransferència de DNA plasmídic en solució al múscul esquelètic els ratolins són anestesiats per via intraperitoneal amb una barreja de ketamina i xilazina en proporció 100:70 mg/kg pes corporal. Seguidament els animals són depilats amb molta cura mitjançant l'ús d'una *Gillette* per tal de facilitar el procediment d'electrotransferència. A continuació es realitza un pretractament amb solució de hialuronidasa (10U/múscul) (Sigma, H-3506) injectada als músculs on es durà a terme l'electrotransferència. Dues hores després es procedeix a la injecció intramuscular del DNA en solució seguida de l'aplicació del camp elèctric amb les condicions següents: 175 V/cm, 10 polsos, 2 Hz, 20 ms (McMahon, 2001).

Totes les injeccions es fan amb xeringues de 0,5 ml amb una agulla de 30 G en una direcció distal-proximal dins dels músculs *tibialis anterior*, *gastrocnemius* i *quadriceps* de ratolins prèviament anestesiats. Per al pretractament amb l'enzim hialuronidasa, s'administren 25 µl d'una solució preparada al moment de hialuronidasa a una concentració de 0,4 U/µl dissolta en solució salina. Els diferents DNA plasmídics injectats són resuspesos en solució salina 0,9% NaCl. El camp elèctric és aplicat mitjançant un electroporador *BTX ECM 830 electroporator* (BTX, USA).

2.15. TRANSFECCIÓ DE CÈL.LULES EN CULTIU.

L'expressió de gens en cèl.lules en cultiu mitjançant la transfecció amb vectors plasmídics és una eina molt adequada per comprovar la funcionalitat dels gens quimèrics abans de la seva microinjecció. D'altra banda, en aquest estudi es va utilitzar la transfecció de cèl.lules en cultiu per realitzar una aproximació de teràpia gènica ex vivo amb la línia cel.lular resultant.

Es va utilitzar la línia de mioblasts de ratolí C₂C₁₂, que es cultiva en plaques de 10 cm de diàmetre a 37° C sota atmòsfera controlada del 5% de CO₂. El medi de cultiu emprat és

DMEM amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS). Les cèl.lules C₂C₁₂ es van cotransfectar utilitzant 10 micrograms de DNA del plàsmid pMLC/GK i 2 micrograms de DNA del plàsmid pPGKneo per placa quan les cèl.lules estaven a un 50% de confluència. El mètode utilitzat per a la transfecció és el de la precipitació de DNA amb fosfat càlcic, incloent-hi un xoc amb glicerol a les 4-6 hores després de l'inici de l'exposició al precipitat.

2.16. TRACTAMENT DE CÈL.LULES EN CULTIU.

Les cèl.lules C₂C₁₂GK i C₂C₁₂ es diferencien en medi DMEM amb un 2% de sèrum de cavall (HS). Per estudiar l'expressió de GK i per determinar els diferents paràmetres metabòlics, les cèl.lules C₂C₁₂GK i C₂C₁₂ diferenciades s'incuben a diferents temps en medi sense sèrum amb les concentracions de glucosa corresponents a cada experiment, 0.5% de BSA i aprotinina (0.1 mg/ml). Al final de cada període d'incubació es recull el medi de cultiu, mentre que les cèl.lules adherides a les plaques es renten amb PBS i a continuació es resuspenen amb àcid acètic 1M per obtenir els extractes cel.lulars. Aquests extractes es centrifuguen 10 min a 7000xg per eliminar restes de membranes. Els sobrenadants dels extractes i el medi de cultiu es guarden a -20° C fins la seva posterior utilització.

2.16.1. Determinació de l'activitat GK en cèl.lules en cultiu.

La mesura d'activitat GK a les cèl.lules transfectades es realitza després de diferenciació dels mioblasts en plaques confluents. Per a la determinació de l'activitat glucoquinasa es segueix el protocol descrit per Davidson i Arion al 1983, basat en la determinació del ritme d'aparició de NADH. Aquesta aparició és proporcional a la fosforilació de la glucosa per la glucoquinasa i la hexoquinasa, gràcies a l'acoplament d'una reacció en la qual es forma 6-fosfogluconat a partir de glucosa-6-P mitjançant l'acció de la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PDH).

Per obtenir els extractes les cèl.lules s'homogenitzen en 1 ml de tampó d'homogenat i es centrifuguen a 29000xg durant 30 minuts a 4° C. S'extreu el sobrenadant i es determina l'activitat enzimàtica a 37° C en un autoanàlitzador COBAS BIO amb dues concentracions diferents de glucosa, 1 i 100 mM. L'activitat GK es calcula com la diferència entre la capacitat de fosforilació de la glucosa a alta concentració i la capacitat a baixa concentració del sucre, que correspon a les activitats de les hexoquinases I i II.

Tampó homogenat pH 7.4

Glicilglicina	50 mM
KCl	120 mM
DTT	1 mM
Aprotinina	20 KIE/ml
PMSF	10 mM

Mescla d'assaig pH 7.4

Glicilglicina	100 mM
KCl	100 mM
DTT	1 mM
ATP	5 mM
NADP	0.5 mM
G6PDH	2 U/ml

Segon reactiu

ATPMg	4.5 mM
Glucosa	1 o 100 mM

2.16.2. Anàlisis metabòliques.

Al medi de cultiu, posteriorment a les incubacions corresponents a cada experiment, es va mesurar la concentració de lactat segons es descriu a l'apartat 2.8.3. La concentració de glucosa del medi es determina espectrofotomètricament amb un autoanalitzador COBAS BIO, utilitzant el kit comercial Gluco-Quant^r, de Boehringer Mannheim. El consum de glucosa es determina com la diferència entre la concentració de glucosa al medi de cultiu al principi de l'experiment i després de varies hores d'incubació.

2.16.2.1. Determinació de la síntesi de glucogen.

Per a la determinació de la síntesi de glucogen, les cèl.lules C₂C₁₂GK i C₂C₁₂ es van cultivar, després de dos dies de diferenciació, en medi DMEM sense sèrum amb una concentració de 5mM de glucosa. Es mantenen en aquest medi durant unes 18 hores, i a continuació es renten i s'incuben durant 90 min en medi DMEM amb glucosa marcada amb C¹⁴ (0.5 microCi/ml) a 37° C en una atmòsfera controlada del 5% de CQ. Seguidament es renten dos cops amb DMEM i es solubilitzen en 500 microlitres de KOH al 30% (v/v). Els extractes es bullen durant 20 minuts i es carreguen sobre paper de cromatografia. Posteriorment, es s'assequen i es submergeixen en un bany fred d'etanol al 66%, per tal de precipitar el glucogen, i es renten quatre vegades amb etanol fred. Els papers s'assequen i es determina la radioactivitat en un comptador de centelleig. Per altra

banda, es determina el contingut de proteïnes totals pel mètode de Bradford per a la posterior normalització dels resultats.

2.16.2.2. Mètode de Bradford.

Aquest mètode de quantificació de proteïnes està basat en el canvi produït en l'espectre d'absorció de certs colorants com a conseqüència de la seva adsorció sobre molècules proteïques. Aquest mètode té una gran sensibilitat i marges amplis de linealitat en la reacció. A partir dels extractes cel·lulars en àcid acètic 1 M es va seguir el protocol detallat pel fabricant (Bio-Rad), utilitzant BSA com a patró.

2. 17. ANÀLISI HISTOLÒGICA.

Els implants de cèl·lules musculars obtinguts dels animals transplantats amb miotubs C₂C₁₂GK i C₂C₁₂ són fixats amb una solució de formol al 10% durant 24-48 hores a 4° C. A continuació, s'inclouen en parafina i es s'obtenen seccions (2-3µm), que posteriorment són desparafinades. Per tal d'estudiar la morfologia dels implants, els talls són tenyits amb hematoxilina, rentats i posteriorment tenyits de nou amb eosina. A continuació es deshidraten i aclareixen les mostres i, finalment, es munten els portaobjectes per tal de visualitzar-les al microscopi de camp clar.

També es van obtenir mostres de fetge dels animals transplantats amb miotubs C₂C₁₂GK i C₂C₁₂, que es sotmeten al mateix procediment per obtenir seccions. Aquestes seccions són posteriorment desparafinades, rentades amb aigua i tractades amb una solució d'àcid periòdic al 5%. A continuació es renten amb aigua destilada i són tenyides amb reactiu de Schiff. Seguidament, es realitza un altre rentat i una nova tinció amb hematoxilina de Mayer per tal de contrastar. Després d'un últim rentat, es realitza el muntatge per tal de visualitzar les mostres al microscopi de camp clar.

2.18. CÀLCULS ESTADÍSTICS.

Els resultats s'expressen com a mitja ± l'error estàndard de la mitja (SEM). L'anàlisi estadístic de les diferències entre les dades es realitza mitjançant la t de Student de dades no aparellades. Les diferències es consideren estadísticament significatives amb una p<0.05.

VII. BIBLIOGRAFIA

Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, Shionoiri F, Yahagi N, Kadowaki T, Tamemoto H, Ishibashi S, Yazaki Y, Makuuchi M (1998) Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J Clin Invest*, **101**(8):1784-8.

Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB (2001) Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, **409**(6821):729-33.

Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H (1996) Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet*, **12**(1):106-9.

Accili D, Nakae J, Kim JJ, Park BC, Rother KI (1999) Targeted gene mutations define the roles of insulin and IGF-I receptors in mouse embryonic development. *Pediatr Endocrinol Metab*, **12**(4):475-85.

Adorini L, Gregori S, Harrison LC (2002) Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends Mol Med*, **8**(1):31-8.

Almind K, Bjorbaek C, Vestergaard H, Hansen T, Echwald S, Pedersen O (1993) Amino acid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*, **342**(8875):828-32.

Almind K, Inoue G, Pedersen O, Kahn CR (1996) A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling. Evidence from transfection studies. *J Clin Invest*, **97**(11):2569-75.

Aoki Y, Cioca DP, Oidaira H, Kamiya J, Kiyosawa K. (2003) RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **30**(1-2):96-102.

Araki E, Sun XJ, Haag BL 3rd, Chuang LM, Zhang Y, Yang-Feng TL, White MF, Kahn CR (1993) Human skeletal muscle insulin receptor substrate-1. Characterization of the cDNA, gene, and chromosomal localization. *Diabetes*, **42**(7):1041-54.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag III B, Johnson RS, Kahn R (1994) Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* **372**, 186-190.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**(1):79-83.

Asano T, Katagiri H, Takata K, Lin JL, Ishihara H, Inukai K, Tsukuda K, Kikuchi M, Hirano H, Yazaki Y, et al. (1991) The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem*, **266**(36):24632-6.

Aspinwall CA, Qian WJ, Roper MG, Kulkarni RN, Kahn CR, Kennedy RT (2000) Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca²⁺ stores in insulin-stimulated insulin secretion in beta -cells. *J Biol Chem*, **275**(29):22331-8.

Baqué S, Montell E, Guinovart JJ, Newgard CB, Gómez-Foix AM (1998) Expression of glucokinase in cultured human muscle cells confers insulin-independent and glucose concentration-dependent increases in glucose disposal and storage. *Diabetes* **47**, 1392-1398.

Barr E, Leiden JM (1993) Systemic delivery of recombinant proteins by genetically modified myoblasts. *Science*, **254**(5037):1507-9.

Barzilai N, Wang J, Massilon D, Vuguin P, Hawkins M, Rossetti L (1997) Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J Clin Invest*, **100**(12):3105-10.

Bell JE, Hume R, Busuttill A, Burchell A (1993) Immunocytochemical detection of the microsomal glucose-6-phosphatase in human brain astrocytes. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **19**(5):429-35.

Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S. (1990) Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*, **13**(3):198-208.

Bell GI, Polonsky KS (2001) Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature*, **414**(6865):788-91.

Beltowski J (2003) Adiponectin and resistin - new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* **9**, RA55-RA61.

Bergman RN, Ader M. (2000) Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab*, **11**(9):351-6.

Bettan, M., F. Emmanuel, et al. (2000) High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Mol Ther*, **2**(3): 204-10.

Blau HM, Chiu CP, Webster C (1983) Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* **32**, 1171-1180.

Blau HM, Springer ML. (1995) Gene therapy--a novel form of drug delivery. *N Engl J Med*, **333**(18):1204-7

Bonadonna RC, Del Prato S, Bonora E, Saccomani MP, Gulli G, Natali A, Frascerra S, Pecori N, Ferrannini E, Bier D, Cobelli C, DeFronzo RA. (1996) Roles of glucose transport and glucose phosphorylation in muscle insulin resistance of NIDDM. *Diabetes*, **45** (7):915-25.

Brinster RL (1982) Growth, nutrition and metabolism of mammalian cells in culture. 2, 251-286. Rothblat, G i Cristofalo, V, eds. Academic Press, NY.

- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter RD (1985) Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**(13):4438-42.
- Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR (1997a) Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell*, **88**(4):561-72.
- Bruning JC, Winnay J, Cheatham B, Kahn CR (1997b) Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells. *Mol Cell Biol*, **17**(3):1513-21
- Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR (1998) A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell*, **2**(5):559-69.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*, **289**(5487):2122-5.
- Bryant NJ, Govers R, James DE (2002) Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**(4):267-77.
- Burant CF, Sivitz WI, Fukumoto H, Kayano T, Nagamatsu S, Seino S, Pessin JE, Bell GI (1991) Mammalian glucose transporters: structure and molecular regulation. *Recent Prog Horm Res*, **47**:349-87.
- Burcelin R, Printz RL, Kande J, Assan R, Granner DK, Girard J.(1993) Regulation of glucose transporter and hexokinase II expression in tissues of diabetic rats. *Am J Physiol*, **265**(3 Pt 1):E392-401.
- Burchell A (1998) A re-evaluation of GLUT 7. *Biochem J*, **331** (Pt 3):973.
- Buse MG, Robinson KA, Gettys TW, McMahon EG, Gulve EA.(1996) Increased activity of the hexosamine synthesis pathway in muscles of insulin-resistant ob/ob mice. *Am J Physiol*, **272**(6 Pt 1):E1080-8.
- Buse MG, Robinson KA, Marshall BA, Hresko RC, Mueckler MM (2002) Enhanced O-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in GLUT1-overexpressing muscles. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* **283**, E241-E250.
- Cardenas ML (1997) Kinetic behaviour of vertebrate hexokinases with emphasis on hexokinase D (IV). *Biochem Soc Trans*, **25**(1):131-5.
- Celi FS, Silver K, Walston J, Knowler WC, Bogardus C, Shuldiner AR (1995) Lack of IRS-1 codon 513 and 972 polymorphism in Pima Indians. *J Clin Endocrinol Metab*, **80**(9):2827-9.
- Chang PY, Jensen J, Printz RL, Granner DK, Ivy JL, Moller DE. (1996) Overexpression of hexokinase II in transgenic mice. Evidence that increased phosphorylation augments muscle glucose uptake. *J Biol Chem*, **271**(25):14834-9.

- Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A (2001) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 9519-9525.
- Cheung JY, Conover C, Regen DM, Whitfield CF, Morgan HE (1978) Effect of insulin on kinetics of sugar transport in heart muscle. *Am J Physiol*, **234**(1):E70-8.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ (2001) Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem*, **276**(42):38349-52.
- Clausen JO, Hansen T, Bjorbaek C, Echwald SM, Urhammer SA, Rasmussen S, Andersen CB, Hansen L, Almind K, Winther K, et al (1995) Insulin resistance: interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet*, **346**(8972):397-402.
- Clement S, Krause U, Desmedt F, Tanti JF, Behrends J, Pesesse X, Sasaki T, Penninger J, Doherty M, Malaisse W, Dumont JE, Le Marchand-Brustel Y, Erneux C, Hue L, Schurmans S (2001) The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature*, **409**(6816):92-7.
- Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI. (1999) Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med*, **341**(4):240-6.
- Crystal RG. (1995) Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science*, **270**(5235):404-10.
- Dai Y, Roman M, Naviaux RK, Verma IM (1992) Gene therapy via primary myoblasts: long-term expression of factor IX protein following transplantation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**(22):10892-5.
- Davidson AL, Arion WJ (1987) Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: physiological implications of higher cellular activity. *Arch Biochem Biophys*, **253**(1):156-67.
- DeFronzo RA (1997) Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis, *Neth J Med*, **50**(5):191-7.
- de la Iglesia N, Veiga-da-Cunha M, Van Schaftingen E, Guinovart JJ, Ferrer JC (1999) Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. *FEBS Lett*, **456**(2):332-8.
- de la Iglesia N, Mukhtar M, Seoane J, Guinovart JJ, Agius L. (2000) The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *J Biol Chem*, **275**(14):10597-603.
- De Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987) Firefly luciferase gene, structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol*, **7**:725-37.

DelloRusso C, Scott JM, Hartigan-O'Connor D, Salvatori G, Barjot C, Robinson AS, Crawford RW, Brooks SV, Chamberlain JS. (2002) Functional correction of adult mdx mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**(20):12979-84.

Deglon N, Heyd B, Tan SA, Joseph JM, Zurn AD, Aebischer P (1996) Central nervous system delivery of recombinant ciliary neurotrophic factor by polymer encapsulated differentiated C2C12 myoblasts. *Hum Gene Ther*, **7**(17):2135-46.

Detheux M, Vandekerckhove J, Van Schaftingen E (1993) Cloning and sequencing of rat liver cDNAs encoding the regulatory protein of glucokinase. *FEBS Lett*, **321**(2-3):111-5. Erratum in: *FEBS Lett*. 1994 Feb 21; **339**(3):312.

Devedjian JC, George M, Casellas A, Pujol A, Visa J, Pelegrin M, Gros L, Bosch F (2000) Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in beta cells develop type 2 diabetes. *J Clin Invest*, **105**(6):731-40.

Dhawan J, Pan LC, Pavlath GK, Travis MA, Lanctot AM, Blau HM (1991) Systemic delivery of human growth hormone by injection of genetically engineered myoblasts. *Science*, **254**(5037):1509-12.

Díez JJ, Iglesias P (2003) The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *European Journal of Endocrinology* **148**, 293-300.

Doerge H, Bocianski A, Scheepers A, Axer H, Eckel J, Joost HG, Schurmann A (2001) Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem J*, **359**(Pt 2):443-9.

Donoghue M, Ernst H, Wentworth B, Nadal-Ginard B, Rosenthal N (1988) A muscle-specific enhancer is located at the 3' end of the myosin light-chain 1/3 gene locus. *Genes Dev*, **2** (12B):1779-90.

Douen AG, Ramlal T, Klip A, Young DA, Cartee GD, Holloszy JO. (1989) Exercise-induced increase in glucose transporters in plasma membranes of rat skeletal muscle. *Endocrinology*, **124**(1):449-54.

Ebihara K, Ogawa Y, Masuzaki H, Shintani M, Miyanaga F, Aizawa-Abe M, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y, Gavrilova O, Reitman ML, Nakao K (2001) Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipotrophic diabetes. *Diabetes*, **50**(6):1440-8.

Efrat S (1998) Prospects for gene therapy of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* **41**, 1401-1409.

Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, **283**(5407):1544-8.

Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR (2000) Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **278**(1):E127-33.

Ferre P, Leturque A, Burnol AF, Penicau L, Girard J (1985) A method to quantify glucose utilization in vivo in skeletal muscle and white adipose tissue of the anesthetized rat. *Biochemical Journal* **228**, 103-110.

Ferre T, Pujol A, Riu E, Bosch F, Valera A (1996a) Correction of diabetic alterations by glucokinase. *Proc. Natl. Acad Sci USA* **93**, 7225-7230.

Ferre T, Riu E, Bosch F, Valera A (1996b) Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB Journal* **10**, 1213-1218.

Ferre T, Riu E, Franckhauser S, Agudo J, Bosch F (2003) Long-term overexpression of glucokinase in the liver of transgenic mice leads to insulin resistance. *Diabetología*, **46**(12):1662-8.

Feinberg AP, Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, **132**(1):6-13. Related Articles, Links

Franckhauser S, Munoz S, Pujol A, Casellas A, Riu E, Otaegui P, Su B, Bosch F. (2000) Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes*, **51**(3):624-30.

Freiesleben De Blasio, B., Bak, P., Pociot, F., Karlsen, A.E. and Nerup, J (1999) Onset of Type 1 diabetes: A dynamical instability. *Diabetes*, **48**: 1677-1685.

Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF (2001) Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(4):2005-10.

Fruman DA, Mauvais-Jarvis F, Pollard DA, Yballe CM, Brazil D, Bronson RT, Kahn CR, Cantley LC (2000) Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nat Genet*, **26**(3):379-82.

Gehl J (2003) Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* **177**, 437-447.

Girard J, Ferre P, Fougère F (1997) Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr*, **17**:325-52.

Gnudi L, Tozzo E, Shepherd PR, Bliss JL, Kahn BB (1995) High level overexpression of glucose transporter-4 driven by an adipose-specific promoter is maintained in transgenic mice on a high fat diet, but does not prevent impaired glucose tolerance. *Endocrinology*, **136**(3):995-1002.

Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL (1995) Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and

phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest*, **95**(5):2195-204.

Grimsby J, Coffey JW, Dvorozniak MT, Magram J, Li G, Matschinsky FM, Shiota C, Kaur S, Magnuson MA, Grippo JF (2000) Characterization of glucokinase regulatory protein-deficient mice. *J Biol Chem*, **275**(11):7826-31.

Gros L, Riu E, Montoliu L, Ontiveros M, Lebrigand L, Bosch F (1999) Insulin production by engineered muscle cells. *Human Gene Therapy* **10**, 1207-1217.

Gulve EA, Ren JM, Marshall BA, Gao J, Hansen PA, Holloszy JO, Mueckler M (1994) Glucose transport activity in skeletal muscle from transgenic mice overexpressing GLUT1. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 18366-18370.

Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS (2001) Protein kinase B (PKB/Akt) - a key regulator of glucose transport?. *FEBS Letters* **492**, 199-203.

Halseth AE, Bracy DP, Wasserman DH (1999) Overexpression of hexokinase II increases insulin- and exercise-stimulated muscle glucose uptake in vivo. *American Journal of Physiology* **276**, E70-E77.

Hansen PA, Gulve EA, Marshall BA, Gao J, Pessin JE, Holloszy JO, Mueckler M (1995) Skeletal muscle glucose transport and metabolism are enhanced in transgenic mice overexpressing the GLUT4 glucose transporter. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 1679-1684.

Hansen PA, Wang W, Marshall BA, Holloszy JO, Mueckler M (1998) Dissociation of GLUT4 translocation and insulin-stimulated glucose transport in transgenic mice overexpressing GLUT1 in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 18173-18179.

Hansen PA, Marshall BA, Chen M, Holloszy JO, Mueckler M. (2000) Transgenic overexpression of hexokinase II in skeletal muscle does not increase glucose disposal in wild-type or Glut1-overexpressing mice. *J Biol Chem*, **275**(29):22381-6.

Hariharan N, Farrelly D, Hagan D, Hillyer D, Arbeeny C, Sabrah T, Treloar A, Brown K, Kalinowski S, Mookhtiar K (1997) Expression of human hepatic glucokinase in transgenic mice liver results in decreased glucose levels and reduced body weight. *Diabetes*, **46**(1):11-6.

Harrison, R. L., B. J. Byrne, et al. (1998) Electroporation-mediated gene transfer in cardiac tissue. *FEBS Lett*, **435**(1): 1-5.

Haverkos, H.W (1997) Could the aetiology of IDDM be multifactorial? *Diabetologia*, **40**: 1235-1240.

Hediger MA, Coady MJ, Ikeda TS, Wright EM (1987) Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature*, **330**(6146):379-81.

Heimberg H, De Vos A, Moens K, Quartier E, Bouwens L, Pipeleers D, Van Schaffingen E, Madsen O, Schuit F (1996) The glucose sensor protein glucokinase is expressed in glucagon-producing alpha-cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**:7036-41.

Heller, L., M. J. Jaroszeski, et al. (2000) Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas in vivo. *Gene Ther*, **7**(10): 826-9.

Hirshman MF, Goodyear LJ, Wardzala LJ, Horton ED, Horton ES. (1990) Identification of an intracellular pool of glucose transporters from basal and insulin-stimulated rat skeletal muscle. *J Biol Chem*, **265**(2):987-91.

Hogan, B., Costantini, F. and Lacy, E. (1986) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Holm E, Hagmuller E, Staedt U, Schlickeiser G, Gunther HJ, Leweling H, Tokus M, Kollmar HB (1995) Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer Research* **55**, 1373-1378.

Hotamisligil GS (1999) The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med*, **245**(6):621-5.

Hotamisligil GS (1999) Mechanisms of TNF- α -induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **107**(2):119-25.

Hughes SD, Quaade C, Milburn JL, Cassidy L, Newgard CB (1991) Expression of normal and novel glucokinase mRNAs in anterior pituitary and islet cells. *J Biol Chem*, **266**(7):4521-30.

Ikemoto S, Thompson KS, Itakura H, Lane MD, Ezaki O. (1995) Expression of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice: effect of exercise and role in glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(3):865-9.

Ikemoto S, Thompson KS, Takahashi M, Itakura H, Lane MD, Ezaki O (1995) High fat diet-induced hyperglycemia: prevention by low level expression of a glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(8):3096-9.

Ilyedjian PB, Ucla C, Mach B (1987) Molecular cloning of glucokinase cDNA. Developmental and dietary regulation of glucokinase mRNA in rat liver. *J Biol Chem*, **262**(13):6032-8

Ilyedjian PB, Gjinovci A, Renold AE (1988) Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats. *J Biol Chem*, **263**(2):740-4.

Ilyedjian PB, Jotterand D, Nospikel T, Asfari M, Pilot PR (1989) Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J Biol Chem*, **264**(36):21824-9.

Ilyedjian PB (1993) Mammalian glucokinase and its gene. *Biochemical Journal* **293**, 1-13.

Jiménez-Chillarón JC, Newgard CB, Gómez-Foix AM (1999) Increased glucose disposal induced by adenovirus mediated transfer of glucokinase to skeletal muscle *in vivo*. *FASEB Journal* **13**, 2153-2160.

Jetton TL, Liang Y, Pettepher CC, Zimmerman EC, Cox FG, Horvath K, Matschinsky FM, Magnuson MA (1994) Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut. *J Biol Chem*, **269**(5):3641-54.

Jimenez-Chillaron JC, Newgard CB, Gomez-Foix AM (1999) Increased glucose disposal induced by adenovirus-mediated transfer of glucokinase to skeletal muscle in vivo. *FASEB J*, **13**(15):2153-60.

Johnson, PG, Gallo SA, et al. (1998) A pulsed electric field enhances cutaneous delivery of methylene blue in excised full-thickness porcine skin. *J Invest Dermatol*, **111**(3): 457-63.

Joost HG, Thorens B (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*, **18**(4):247-56.

Kaburagi Y, Satoh S, Tamemoto H, Yamamoto-Honda R, Tobe K, Veki K, Yamauchi T, Kono-Sugita E, Sekihara H, Aizawa S, Cushman SW, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T (1997) Role of insulin receptor substrate-1 and pp60 in the regulation of insulin-induced glucose transport and GLUT4 translocation in primary adipocytes. *J Biol Chem*, **272**(41):25839-44.

Kanh BB (1992) Facilitative glucose transporter regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J Clin Invest*, **89**(5):1367-74

Kahn BB. (1996) Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes*, **45**(11):1644-54.

Kahn CR (1994) Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, **43**(8):1066-84.

Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ (1997) Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*, **389**(6649):374-7.

Kanai Y, Lee WS, You G, Brown D, Hediger MA (1994) The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J Clin Invest*, **93**(1):397-404.

Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ (1995) Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature*, **377**(6545):151-5.

Katzen HM, Schimke RT (1965) Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **54**(4):1218-25.

Kayano T, Burant CF, Fukumoto H, Gould GW, Fan YS, Eddy RL, Byers MG, Shows TB, Seino S, Bell GI (1990) Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem*, **265**(22):13276-82.

Kennedy A, Gettys TW, Watson P, Wallace P, Ganaway E, Pan Q, Garvey WT (1997) The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**(4):1293-300.

Keppler, D and Decker, K (1984) Glycogen. In *Methods of enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., Ed in Chief) VI 11-18 verlag Chemie, Weinheim, Germany.

Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, Accili D (2000) Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest*, **105**(2):199-205.

Kieffer TJ, Heller RS, Leech CA, Holz GG, Habener JF (1997) Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, **46**(6):1087-93.

Kim JK, Michael MD, Previs SF, Peroni OD, Mauvais-Jarvis F, Neschen S, Kahn BB, Kahn CR, Shulman GI (2000) Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest*, **105**(12):1791-7.

Kim JK, Zisman A, Fillmore JJ, Peroni OD, Kotani K, Perret P, Zong H, Dong J, Kahn CR, Kahn BB, Shulman GI (2001) Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. *Journal of Clinical Investigation* **108**, 153-160.

King H, Rewers M (1993) Diabetes in adults is now a Third World problem. World Health Organization Ad Hoc Diabetes Reporting Group. *Ethn Dis*, **3** Suppl:S67-74.

Kipnisdm, Coricf (1959) Studies of tissue permeability. V. The penetration and phosphorylation of 2-deoxyglucose in the rat diaphragm. *J Biol Chem*, **234**(1):171-7.

Kipnisdm, Helmreiche, Coricf (1959) Studies of tissue permeability. IV. The distribution of glucose between plasma and muscle. *J Biol Chem*, **234**(1):165-70.

Klaman LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, Moghal N, Lubkin M, Kim YB, Sharpe AH, Stricker-Krongrad A, Shulman GI, Neel BG, Kahn BB. (2000) Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol*, **20**(15):5479-89.

Kraegen EW, James DE, Storlien LH, Burleigh KM, Chisholm DJ (1986) In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia*, **29**(3):192-8.

Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T (2000) Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes*, **49**(11):1880-9.

Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR (1999) Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*, **96**(3):329-39.

Kulkarni RN, Winnay JN, Daniels M, Bruning JC, Flier SN, Hanahan D, Kahn CR (2000) Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J Clin Invest*, **104**(12):R69-75.

Kulkarni RN, Almind K, Goren HJ, Winnay JN, Ueki K, Okada T, Kahn CR. (2003) Impact of genetic background on development of hyperinsulinemia and diabetes in insulin receptor/insulin receptor substrate-1 double heterozygous mice. *Diabetes*, **52**(6):1528-34.

Kwon NS, Lee SH, Choi CS, Kho T, Lee HS (1994) Nitric oxide generation from streptozotocin. *FASEB J*, **8**(8):529-33.

Lackner R, Challiss RA, West D, Newsholme EA (1984) A problem in the radiochemical assay of glucose-6-phosphatase in muscle. *Biochem J*, **218**(2):649-51.

Li J, Yu X, Pan W, Unger RH (2002) Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**(6):E1334-41.

Liang Y, Jetton TL, Zimmerman EC, Najafi H, Matschinsky FM, Magnuson MA (1991) Effects of alternate RNA splicing on glucokinase isoform activities in the pancreatic islet, liver, and pituitary. *J Biol Chem*, **266**(11):6999-7007.

Liang Y, Najafi H, Smith RM, Zimmerman EC, Magnuson MA, Tal M, Matschinsky FM (1992) Concordant glucose induction of glucokinase, glucose usage, and glucose-stimulated insulin release in pancreatic islets maintained in organ culture. *Diabetes*, **41**(7):792-806.

Lisinski I, Schurmann A, Joost HG, Cushman SW, Al-Hasani H (2001) Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem J*, **358**:517-22.

Liu ML, Gibbs EM, McCoid SC, Milici AJ, Stukenbrok HA, McPherson RK, Treadway JL, Pessin JE (1993) Transgenic mice expressing the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter protein exhibit efficient glycemic control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(23):11346-50.

Lombardi AM, Moller D, Loizeau M, Girard J, Leturque A (1997) Phenotype of transgenic mice overexpressing GLUT4 and hexokinase II in muscle. *FASEB Journal* **611**, 1137-1144.

Magnuson MA, Andreone TL, Printz RL, Koch S, Granner DK (1989) Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**(13):4838-42.

Magnuson MA (1990) Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular genetic studies. *Diabetes*, **39**(5):523-7.

Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y (1980) Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*, **29**(1):1-13.

Manchester J, Kong X, Nerbonne J, Lowry OH, Lawrence JC Jr (1994) Glucose transport and phosphorylation in single cardiac myocytes: rate-limiting steps in glucose metabolism. *Am J Physiol*, **266**(3 Pt 1):E326-33.

Manchester J, Skurat AV, Roach P, Hauschka SD, Lawrence JC Jr (1996) Increased glycogen accumulation in transgenic mice overexpressing glycogen synthase in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(20):10707-11.

Mandarino LJ, Printz RL, Cusi KA, Kinchington P, O'Doherty RM, Osawa H, Sewell C, Consoli A, Granner DK, DeFronzo RA (1995) Regulation of hexokinase II and glycogen synthase mRNA, protein, and activity in human muscle. *Am J Physiol*, **269**:E701-8.

Marshall BA, Ren JM, Johnson DW, Gibbs EM, Lillquist JS, Soeller WC, Holloszy JO, Mueckler M (1993) Germline manipulation of glucose homeostasis via alteration of glucose transporter levels in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 18442-18445.

Marshall BA, Hansen PA, Ensor NJ, Ogden MA, Mueckler M. (1999) GLUT-1 or GLUT-4 transgenes in obese mice improve glucose tolerance but do not prevent insulin resistance. *Am J Physiol*, **276**(2 Pt 1):E390-400.

Maruyama, H., M. Sugawa, et al. (2000) Continuous erythropoietin delivery by muscle-targeted gene transfer using in vivo electroporation, *Hum Gene Ther*, **11**(3): 429-37.

Matthews DR, Cull CA, Stratton IM, Holman RR, Turner RC. (1998) UKPDS 26: Sulphonylurea failure in non-insulin-dependent diabetic patients over six years. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Diabet Med*, **15**(4):297-303.

Mauvais-Jarvis F, Kulkarni RN, Kahn CR (2002) Knockout models are useful tools to dissect the pathophysiology and genetics of insulin resistance. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **57**(1):1-9.

McMahon, J. M., E. Signori, et al. (2001) Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase -- increased expression with reduced muscle damage. *Gene Ther*, **8**(16): 1264-70

Meglasson MD, Matschinsky FM (1984) New perspectives on pancreatic islet glucokinase. *Am J Physiol*, **246**(1 Pt 1):E1-13.

Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR (2000) Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell*, **6**(1):87-97.

Miles JM, Rizza RA, Haymond MW, Gerich JE. (1980) Effects of acute insulin deficiency on glucose and ketone body turnover in man: evidence for the primacy of overproduction of glucose and ketone bodies in the genesis of diabetic ketoacidosis. *Diabetes*, **29**(11):926-30.

Mir, L. M., M. F. Bureau, et al. (1999) High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(8): 4262-7.

Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW (1998) Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **22**(12):1145-58.

- Mori H, Hashiramoto M, Kishimoto M, Kasuga M (1995) Amino acid polymorphisms of the insulin receptor substrate-1 in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, **80**(9):2822-6.
- Morral N, McEvoy R, Dong H, Meseck M, Altomonte J, Thung S, Woo SL. (2002) Adenovirus-mediated expression of glucokinase in the liver as an adjuvant treatment for type 1 diabetes. *Hum Gene Ther*. 2002 Sep 1;13(13):1561-70. Related Articles, Links
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**, 941-945.
- Mueckler M, Kruse M, Strube M, Riggs AC, Chiu KC, Permutt MA (1994) A mutation in the Glut2 glucose transporter gene of a diabetic patient abolishes transport activity. *Journal Biol Chem*, **269**(27):17765-7.
- Mulligan RC. (1993) The basic science of gene therapy. *Science*, **260** (5110):926-32.
- Muzzin P, Eisensmith RC, Copeland KC, Woo SL (1997) Hepatic insulin gene expression as treatment for type 1 diabetes mellitus in rats. *Mol Endocrinol*, **11**:833-7.
- Napoli R, Hirshman MF, Horton ES.(1995) Mechanisms of increased skeletal muscle glucose transport activity after an oral glucose load in rats. *Diabetes*, **44**(12):1362-8.
- Napoli R, Hirshman MF, Horton ES. (1995) Mechanisms and time course of impaired skeletal muscle glucose transport activity in streptozocin diabetic rats. *J Clin Invest*, **96**(1):427-37.
- Neumann E, Kakorin S, Toensing K (1999) Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem Bioenerg*, **48**(1):3-16.
- Newgard CB, Hirsch LJ, Foster DW, McGarry JD (1983) Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat: A direct or and indirect pathway? *Journal of Biological Chemistry* **258**, 8046-8052.
- Newgard CB, Moore SV, Foster DW, McGarry JD (1984a) Efficient hepatic glycogen synthesis in refeeding rats requires continued carbon flow through the gluconeogenic pathway. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 6958-6963.
- Newgard CB, Foster DW, McGarry JD (1984b) Evidence for suppression of hepatic glucose-5-phosphatase with carbohydrate feeding. *Diabetes* **33**, 192-195.
- Niswender KD, Shiota M, Postic C, Cherrington AD, Magnuson MA. (1997) Effects of increased glucokinase gene copy number on glucose homeostasis and hepatic glucose metabolism. *J Biol Chem*, **272**(36):22570-5.
- Niswender KD, Postic C, Shiota M, Jetton TL, Magnuson MA (1997) Effects of altered glucokinase gene copy number on blood glucose homeostasis. *Biochem Soc Trans*, **25**(1):113-7.

O'Doherty RM, Lehman DL, Seoane J, Gomez-Foix AM, Guinovart JJ, Newgard CB (1996) Differential metabolic effects of adenovirus-mediated glucokinase and hexokinase I overexpression in rat primary hepatocytes. *J Biol Chem*, **271**:20524-30.

O'Doherty RM, Lehman DL, Telemaque-Potts S, Newgard CB (1999) Metabolic impact of glucokinase overexpression in liver: lowering of blood glucose in fed rats is accompanied by hyperlipidemia. *Diabetes*, **48**(10):2022-7.

Ogata N, Chikazu D, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Azuma Y, Ohta T, Kadowaki T, Nakamura K, Kawaguchi H (2000) Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J Clin Invest*, **105**(7):935-43.

Olson AL, Liu ML, Moyer-Rowley WS, Buse JB, Bell GI, Pessin JE (1993) Hormonal/metabolic regulation of the human GLUT4/Muscle-fat facilitative glucose transporter gene in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 9839-9846.

Olson AL, Pessin JE (1996). Structure, function and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annual Reviews of Nutrition* **16**, 235-256.

O'Rahilly S, Gray H, Humphreys PJ, Krook A, Polonsky KS, White A, Gibson S, Taylor K, Carr C (1995) Brief report: impaired processing of prohormones associated with abnormalities of glucose homeostasis and adrenal function. *N Engl J Med*, **333**(21):1386-90.

Otaegui PJ, Ferre T, Pujol A, Riu E, Jimenez R, Bosch F (2000) Expression of glucokinase in skeletal muscle: a new approach to counteract diabetic hyperglycemia. *Human Gene Therapy* **11**, 1543-1552.

Otaegui PJ, Ferre T, Riu E, Bosch F. (2003) Prevention of obesity and insulin resistance by glucokinase expression in skeletal muscle of transgenic mice. *FASEB J*, **17**(14):2097-9. Epub 2003 Sep 18.

Papaccio G, Pisanti FA, Latronico MV, Ammendola E, Galdieri M (2000) Multiple low-dose and single high-dose treatments with streptozotocin do not generate nitric oxide. *J Cell Biochem*, **77**(1):82-91.

Pendergrass M, Koval J, Vogt C, Yki-Jarvinen H, Iozzo P, Pipek R, Ardehali H, Printz R, Granner D, DeFronzo RA, Mandarino LJ. (1998) Insulin-induced hexokinase II expression is reduced in obesity and NIDDM. *Diabetes*, **47**(3):387-94.

Pessin JE, Bell GI (1992) Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu Rev Physiol*, **54**:911-30.

Pessin JE, Saltiel AR. (2000) Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*, **106**(2):165-9.

Pickup JC and Williams G (1994). Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Pickup JC, Roberts GA, Kehely AM, Pasapula C, Chusney GD, Mather HM (1997) Higher serum sialic acid in women than in men with NIDDM: possible relevance to increased cardiovascular risk in NIDDM women. *Diabetes Care*, **20**(9):1496.

Pilkis SJ, Granner DK (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol*, **54**:885-909.

Ploug T, van Deurs B, Ai H, Cushman SW, Ralston E. (1998) Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions. *J Cell Biol*, **142**(6):1429-46.

Ploug T, Ralston E. (1998) Anatomy of glucose transporters in skeletal muscle. Effects of insulin and contractions. *Adv Exp Med Biol*, **441**:17-26.

Postic C, Leturque A, Printz RL, Maulard P, Loizeau M, Granner DK, Girard J (1994) Development and regulation of glucose transporter and hexokinase expression in rat. *American Journal of Physiology* **266**, E548-E559.

Postic C, Shiota M, Magnuson MA (2001) Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. *Recent Prog Horm Res* **56**, 195-217.

Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI (2000) Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *JBiolChem*, **275**(50):38990-4.

Printz RL, Magnuson MA, Granner DK (1993) Mammalian glucokinase. *Annual Reviews of Nutrition* **13**, 463-496.

Printz RL, Osawa H, Ardehali H, Koch S, Granner DK (1997) Hexokinase II gene: structure, regulation and promoter organization. *Biochem Soc Trans*, **25**(1):107-12.

Rao MV, Donoghue MJ, Merlie JP, Sanes JR. (1996) Distinct regulatory elements control muscle-specific, fiber-type-selective, and axially graded expression of a myosin light-chain gene in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, **16**(7):3909-22.

Rayner DV, Thomas ME, Trayhurn P (1994) Glucose transporters (GLUTs 1-4) and their mRNAs in regions of the rat brain: insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum. *Can J Physiol Pharmacol*, **72**(5):476-9. Erratum in: *Can J Physiol Pharmacol* (1994)

Rea S, James DE. (1997) Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes*, **46**(11):1667-77.

Ren JM, Marshall BA, Gulve EA, Gao J, Johnson DW, Holloszy JO, Mueckler M (1993) Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 16113-16115.

Ren JM, Semenkovich CF, Gulve EA, Gao J, Holloszy JO (1994) Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J Biol Chem*, **269**(20): 14396-401.

Richter EA, Derave W, Wojtaszewski JF (2001) Glucose, exercise and insulin: emerging concepts. *J Physiol*, **535**(Pt 2):313-22.

Rinsch C, Regulier E, Deglon N, Dalle B, Beuzard Y, Aebischer P (1997) A gene therapy approach to regulated delivery of erythropoietin as a function of oxygen tension. *Hum Gene Ther*, **8**(16):1881-9.

Riu E, Mas A, Ferre T, Pujol A, Gros L, Otaegui P, Montoliu L, Bosch F. (2002) Counteraction of type 1 diabetic alterations by engineering skeletal muscle to produce insulin: insights from transgenic mice. *Diabetes*, **51**(3):704-11.

Rogers S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Henderson MA, Soeller WC, Gibbs EM, James DE, Best JD (2002) Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**(3):E733-8.

Rothman DL, Shulman RG, Shulman GI. (1992) ³¹P nuclear magnetic resonance measurements of muscle glucose-6-phosphate. Evidence for reduced insulin-dependent muscle glucose transport or phosphorylation activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, **89**(4):1069-75.

Rosenthal N, Kornhauser JM, Donoghue M, Rosen KM, Merlie JP (1989) Myosin light chain enhancer activates muscle-specific, developmentally regulated gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 7780-7784.

Rosholt MN, King PA, Horton ES (1994) High-fat diet reduces glucose transporter responses to both insulin and exercise. *Am J Physiol*, **266**(1 Pt 2):R95-101.

Rossini AA, Apel MC, Williams RM, Like AA (1977) Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia. *J. Am. Diabet. Assoc.* **26**, 916-920.

Sasaki T, Minoshima S, Shiohama A, Shintani A, Shimizu A, Asakawa S, Kawasaki K, Shimizu N (2001) Molecular cloning of a member of the facilitative glucose transporter gene family GLUT11 (SLC2A11) and identification of transcription variants. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**(5):1218-24.

Shepherd PR, Kahn BB (1999) Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*, **341**(4):248-57.

Shimabukuro M, Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH (1998) Protection against lipoapoptosis of beta cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(16):9558-61.

Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. (1999) Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature*, **401**(6748):73-6.

Shiota C, Coffey J, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA (1999) Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J Biol Chem*, **274**(52):37125-30.

Shiota M, Postic C, Fujimoto Y, Jetton TL, Dixon K, Pan D, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA, Cherrington AD (2001) Glucokinase gene locus transgenic mice are resistant to the development of obesity-induced type 2 diabetes.

Diabetes. 2001 Mar;**50**(3):622-9.

Shirakami A, Toyonaga T, Tsuruzoe K, Shirotani T, Matsumoto K, Yoshizato K, Kawashima J, Hirashima Y, Miyamura N, Kahn CR, Araki E (2002) Heterozygous knockout of the IRS-1 gene in mice enhances obesity-linked insulin resistance: a possible model for the development of type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology* **174**, 309-319.

Shulman GI. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, **106**(2):171-6.
Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977) The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem*, **28**(5):897-916.

Stenbit AE, Tsao TS, Li J, Burcelin R, Geenen DL, Factor SM, Houseknecht K, Katz EB, Charron MJ (1997) GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med*, **3**(10):1096-101.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, **409**(6818):307-12.

Stevenson RW, McPherson RK, Persson LM, Genereux PE, Swick AG, Spitzer J, Herbst JJ, Andrews KM, Kreutter DK, Gibbs EM (1996) The antihyperglycemic agent englitazone prevents the defect in glucose transport in rats fed a high-fat diet. *Diabetes*, **45**(1):60-6.

Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW (1986) Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am J Physiol*, **251**(5 Pt 1):E576-83.

Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW (1991) Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes*, **40**(2):280-9.

Storlien LH, Baur LA, Kriketos AD, Pan DA, Cooney GJ, Jenkins AB, Calvert GD, Campbell LV (1996) Dietary fats and insulin action. *Diabetologia*, **39**(6):621-31.

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Baker JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ and White MF (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, **352**:73-77.

Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN (1988) Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, **37**(9):1163-7.

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, Sekihara H, Yoshloka S, Horikoshi H, Furuta Y, Ikawa Y, Kasuga M, Yazaki Y, Alzawa S (1994) Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* **372**, 182-186.

Terauchi Y, Iwamoto K, Tamemoto H, Komeda K, Ishii C, Kanazawa Y, Asanuma N, Aizawa T, Akanuma Y, Yasuda K, Kodama T, Tobe K, Yazaki Y, Kadowaki T. (1997)

Development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the double knockout mice with disruption of insulin receptor substrate-1 and beta cell glucokinase genes. Genetic reconstitution of diabetes as a polygenic disease. *J Clin Invest*, **99**(5):861-6.

Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, Minoura H, Murakami K, Okuno A, Inukai K, Asano T, Kaburagi Y, Ueki K, Nakajima H, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Sekihara H, Yin Y, Barrett JC, Oda H, Ishikawa T, Akanuma Y, Komuro I, Suzuki M, Yamamura K, Kodama T, Suzuki H, Kadowaki T, et al (1999) Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat Genet*, **21**(2):230-5.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, **20**: 1183-1197.

Thomas HM, Brant AM, Colville CA, Seatter MJ, Gould GW. (1992) Tissue-specific expression of facilitative glucose transporters: a rationale. *Biochem Soc Trans*, **20**(3):538-42.

Thorburn AW, Gumbiner B, Bulacan F, Brechtel G, Henry RR. (1991) Multiple defects in muscle glycogen synthase activity contribute to reduced glycogen synthesis in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, **87**(2):489-95.

Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF (1988) Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell*, **55**(2):281-90.

Thorens B (1992) Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-K_m facilitated diffusion glucose transporter. *Int Rev Cytol*, **137**:209-38.

Thorens B, Gerard N, Deriaz N (1993) GLUT2 surface expression and intracellular transport via the constitutive pathway in pancreatic beta cells and insulinoma: evidence for a block in trans-Golgi network exit by brefeldin A. *J Cell Biol.*, **123**(6 Pt 2):1687-94

Tippett PS, Neet KE (1982) An allosteric model for the inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzyme A. *J Biol Chem*, **257**(21):12846-52.

Tippett PS, Neet KE (1982) Specific inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzymes A below the critical micelle concentration. *J Biol Chem*, **257**(21):12839-45.

Todd, J.A., Farrall, M. (1996) Panning for gold: genome-wide scanning for linkage in type 1 diabetes. *Hum Mol Genet*, **5**: 1443- 1448.

Toyoda Y, Yoshie S, Fujita T, Ito Y, Nonogaki T, Miwa I (1997) Glucokinase is located in secretory granules of pancreatic D-cells. *FEBS Lett*, **415**(3):281-4.

Treadway JL, Hargrove DM, Nardone NA, McPherson RK, Russo JF, Milici AJ, Stukenbrok HA, Gibbs EM, Stevenson RW, Pessin JE (1994) Enhanced peripheral glucose utilization in transgenic mice expressing the human GLUT4 gene. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 29956-29961.

- Tsao TS, Katz EB, Pommer D, Charron MJ (2000) Amelioration of insulin resistance but not hyperinsulinemia in obese mice overexpressing GLUT4 selectively in skeletal muscle. *Metabolism* **49**, 340-346.
- Turk E, Zabel B, Mundlos S, Dyer J, Wright EM (1991) Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature*, **350** (6316):354-6.
- Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML. (1993) Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun.* 197(3):1458-64.
- Unger RH (1991) Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science*, 251(1998):1200-5.
- Ura S, Araki E, Kishikawa H, Shirotani T, Todaka M, Isami S, Shimoda S, Yoshimura R, Matsuda K, Motoyoshi S, Miyamura N, Kahn CR, Shichiri M (1996) Molecular scanning of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene in Japanese patients with NIDDM: identification of five novel polymorphisms. *Diabetología*, **39**(5):600-8.
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*, **389**(6651):610-4.
- Valera A, Bosch F (1994) Glucokinase expression in rat hepatoma cells induce glucose uptake and is rate limiting in glucose utilization. *European Journal of Biochemistry* **222**, 533-539.
- Valera A, Pujol A, Pelegrin M, Bosch F (1994) Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(19):9151-4.
- Vandercammen A, Van Schaftingen E (1990) The mechanism by which rat liver glucokinase is inhibited by the regulatory protein. *Eur J Biochem*, **191**(2):483-9.
- Van Schaftingen E (1989) A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. *Eur J Biochem*, **179**(1):179-84.
- Van Schaftingen E, Vandercammen A, Dethoux M, Davies DR (1992) The regulatory protein of liver glucokinase. *Adv Enzyme Regul*, **32**:133-48.
- Wang H, Iynedjian PB (1997) Acute glucose intolerance in insulinoma cells with unbalanced overexpression of glucokinase. *J Biol Chem*, **272**(41):25731-6.
- Wang H, Iynedjian PB (1997) Modulation of glucose responsiveness of insulinoma beta-cells by graded overexpression of glucokinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**(9):4372-7.
- Weinhouse S (1976) Regulation of glucokinase in liver. *Curr Top Cell Regul*, **11**:1-50.
- Wang MY, Koyama K, Shimabukuro M, Mangelsdorf D, Newgard CB, Unger RH (1998) Overexpression of leptin receptors in pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats restores

GLUT-2, glucokinase, and glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(20):11921-6.

Wells RG, Pajor AM, Kanai Y, Turk E, Wright EM, Hediger MA (1992) Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter. *Am J Physiol*, **263**:F459-65.

Wells RG, Hediger MA (1992) Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(12):5596-600.

Wentworth BM, Donoghue M, Engert JC, Berglund EB, Rosenthal N (1991) Paired MyoD-binding sites regulate myosin light chain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(4):1242-6.

Widjaja A, Stratton IM, Horn R, Holman RR, Turner R, Brabant G (1997) UKPDS 20: plasma leptin, obesity, and plasma insulin in type 2 diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**(2):654-7.

Wilson GL, Patton NJ, McCord JM, Mullins DW, Mossman BT (1984) Mechanisms of streptozotocin- and alloxan-induced damage in rat B cells. *Diabetologia*, **27**(6):587-91.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, **391**(6670):900-4.

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**(4949 Pt 1):1465-8.

Wood SI and Trayhurn P (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition* **89**, 3-9.

Wright EM, Hirayama B, Hazama A, Loo DD, Supplisson S, Turk E, Hager KM (1993) The sodium/glucose cotransporter (SGLT1). *Soc Gen Physiol Ser*, **48**:229-41.

Wright EM (1993) The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annu Rev Physiol*, **55**:575-89.

Wright EM (2001) Renal Na⁽⁺⁾-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol*, **280**(1):F10-8.

Yaffe D, Saxel O (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**, 725-727.

Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Yoshizawa F, Aizawa S, Akanuma Y, Sonenberg N, Yazaki Y, Kadowaki T (1996) Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol.*, **16**(6):3074-84.

Yamauchi A, Amano K, Ichikawa Y, Nakamoto S, Takei I, Maruyama H, Kono N, Saruta T (1996) McArdle's disease with non-insulin-dependent diabetes mellitus: the beneficial

effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia for exercise intolerance. *Intern Med*, **35**(5):403-6.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*, **7**(8):941-6.

Yamazaki Y, Yagi T et al. (2000) In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. *J Exp Zool*, **286**(2): 212-8

Yaspelkis BB 3rd, Ansari L, Ramey EL, Holland GJ, Loy SF. (1999) Chronic leptin administration increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake and transport. *Metabolism*, **48**(5):671-6.

Yaspelkis BB 3rd, Davis JR, Saberi M, Smith TL, Jazayeri R, Singh M, Fernandez V, Trevino B, Chinookoswong N, Wang J, Shi ZQ, Levin N. (2001) Leptin administration improves skeletal muscle insulin responsiveness in diet-induced insulin-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **280**(1):E130-42. Related Articles, Links

Yaspelkis BB 3rd, Saberi M, Singh MK, Trevino B, Smith TL. (2002) Chronic leptin treatment normalizes basal glucose transport in a fiber type-specific manner in high-fat-fed rats. *Metabolism*, **51**(7):859-63.

Yun, J.S. and Wagner, T.E. (1989) "Methods to produce transgenic mice". Edison Center Biotechnology animal-laboratory manual.

Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*, **293**(5535):1673-7.

Zierath JR, Houseknecht KL, Gnudi L, Kahn BB (1997) High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment via an early insulin-signaling defect. *Diabetes*, **46**(2):215-23.

Zimmet, P., Alberti, K.G. and Shaw, J. (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, **414**: 782-787.

Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR, Kahn BB (2000) Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med*, **6**(8):924-8.