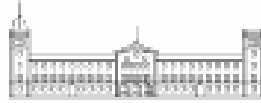


Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona



IDENTIFICACIÓ, LOCALITZACIÓ I REGULACIÓ DE
L'IDURONAT-2-SULFATASA ALS ILLOTS PANCREÀTICS

Memòria presentada per Imma Coronado Pons per optar al Grau de
Doctora en Bioquímica i Biologia Molecular

Barcelona, 2003

AGRAÏMENTS

Al Dr. Ramon Gomis, Cap de Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Clínic de Barcelona, director d'aquesta tesi, per introduir-me en el món de la recerca i haver-me donat tot el suport per elaborar aquest treball.

A la Dra. Anna Novials, Cap de Servei del Departament de Diabetis de la Fundació Sardà Farriol, codirectora d'aquesta tesi, per tot el seu ajut en el desenvolupament d'aquesta tesi i en les publicacions derivades.

A la Dra. Anne Clark, Cap del Laboratori de Diabetis del Hospital Churchill d'Oxford, per la seva hospitalitat i pels suggeriments i observacions crítiques del projecte.

A tots els companys i ex-companys del Laboratori Experimental de Diabetis: Aurora, Carmen B, per tots els vostres consells. Àngels T, Pepi, Carmen F, Marta EF, Josep, Belén, Rosa, Sílvia B, Sandra, Marta, Albert, Jordi, Núria P, Conxi, Núria M, José Luís, Isabel C, Eugènia, Maria, Nacho, Marc, per totes les estones compartides durant aquest temps. Aïda, per la teva alegria i bon humor i a l'Helena, per tota la teva ajuda científica i moral.

A l'Elena F i la Mònica G, que varen formar part del Laboratori Experimental de Diabetis i a les vull agrair tot l'ajut que varen aportar per la realització d'aquesta tesi. En especial a l'Elena F, que va ser la postdoctoral d'aquest projecte i va posar a punt tota la metodologia dels vectors lentivirals.

A tots els membres de l'equip de pàncreas humà i als qui heu estat al capdavant de l'organització de l'equip.

A tots els membres del Servei d'Endocrinologia de l'Hospital Clínic, al personal mèdic adjunt, als residents, al personal d'infermeria i a la Rosa M^a Viaplana, la Berta i l'Anna Bosch.

A tots els membres de la Fundació Sardà Farriol.

A la Dra. Roser Casamitjana, pel seu ajut en el desenvolupament dels radioimmuniassatjos.

A la Dra. Dolors Colomer del Departament de Patologia i Hematologia de l'Hospital Clínic, per la seva paciència i ajut en la posta a punt de la PCR a temps real.

A la Dra. Carmen López i la Sònia dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona, per tot el seu ajut en la hibridació in situ.

Al Servei de Coordinació de trasplantaments de l'Hospital Clínic per la obtenció de teixit pancreàtic humà.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias, a la Fundació Clínic i a la Fundació Marató TV3, per la beca concedida que ha permès aquest treball.

A la meva part de família de Vic, per perdonar que els hagi tingut una mica abandonats durant la realització d'aquesta tesi.

A tota la meva altra família, per tot el seu suport. A l'Eduard i la Marina per suportar els meus nervis. I en especial, als meus pares Joan i Conxita, per creure en mi i pels ànims que m'han donat durant tot aquest temps, sobretot en els moments de feblesa moral.

I en David, per la seva comprensió i paciència, i en especial, per ensenyar-me a gaudir de la vida.

ABREVIATURES

aa	aminoàcid
cDNA	DNA complementari
CMV	citomegalovirus
DNA	àcid desoxiribonucleic
DNasa	desoxiribonucleasa
dNTP	desoxiribonucleòtid trifosfat
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HS	heparan sulfat
IDS	iduronat-2-sulfatasa
KDa	quilodaltons
mRNA	RNA missatger
pb	Parell de bases nitrogenades
PBS	Tampó fosfat salí
PC	Convertasa de prohormones
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PG	proteoglicà
RE	reticle endoplasmàtic
RIA	radioimmunoassaig
RNA	àcid ribonucleic
RNasa	ribonucleasa
SDS	dodecilsulfat de sodi
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina
UV	Ultraviolat

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	3
1.- L'illot pancreàtic	3
1.1.- Anatomia i organització de l'illot pancreàtic	3
1.2.- Secreció d'insulina	5
1.3.- Lisosomes i funció de l'illot pancreàtic	9
1.3.1.- Biologia del lisosoma	9
1.3.2.- El lisosoma a l'illot pancreàtic	12
2.- Dipòsits d'amiloid	14
2.1.- Descripció	14
2.2.- Components del dipòsit	17
2.3.- Localització i inici de l'amiloid	24
2.4.- Mecanismes de formació de l'amiloid	27
2.5.- Dipòsits d'amiloid i diabetis tipus 2	30
3.- El proteoglicà heparan sulfat, perlecan	34
3.1.- El gen i estructura molecular del perlecan	34
3.2.- Expressió i regulació del perlecan	38
3.3.- Perlecan i complicacions de la diabetis	41
4.- Iduronat-2-sulfatasa	48
4.1.- Les hidrolases lisosòmiques	48
4.2.- El gen IDS	50
4.2.1.- El pseudogen IDS	50
4.2.2.- El gen ratolí IDS	52
4.3.- Estructura molecular i biosíntesi de l'IDS	52
4.4.- Expressió de l'IDS	54
4.5.- Malaltia de Hunter. Mucopolisacaridosis II	55
4.5.1.- Teràpia gènica i models animals	56
HIPÒTESI I OBJECTIUS GENERALS	61
OBJECTIU I	67
1.- Material i mètodes I	71
1.1.- Obtenció d'illots pancreàtics de ratolí	71

1.2.- Obtenció d'illots pancreàtics humans	73
1.3.- Extracció de RNA total	77
1.4.- Síntesi de cDNA	80
1.4.1.- Tractament amb Dnasa	80
1.4.2.- Transcripció reversa (RT)	81
1.5.- Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	83
1.6.- Electroforesi d'àcids nucleics en gels d'agarosa	85
1.7.- Construccions plasmídiques. Subclonatge	86
1.7.1.- Característiques del vector	87
1.7.2.- Obtenció del cDNA d'interès	88
1.7.3.- Purificació dels fragments de DNA dels gels d'agarosa	89
1.7.4.- Quantificació	90
1.7.5.- Digestió del DNA per endonucleases de restricció	91
1.7.6.- Extracció fenol/cloroform i precipitació amb etanol	92
1.7.7.- Formació de recombinants amb l'enzim lligasa	94
1.7.8.- Transformació bacteriana	95
1.7.9.- Anàlisi de recombinants	98
1.7.10.- Esquema del clonatge	101
1.8.- Cultiu cel·lular	102
1.9.- Transfecció cel·lular	105
1.10.- Immunofluorescència indirecta	106
1.11.- Producció de l'anticòs contra l'IDS	108
2.- Resultats I	109
2.1.- Expressió de l'IDS al teixit pancreàtic humà	109
2.2.- Expressió de l'IDS al teixit pancreàtic de ratolí	111
2.3.- Expressió de l'IDS a línies cel·lulars	112
2.4.- Localització subcel·lular de l'IDS	113
3.- Discussió I	117
OBJECTIU II	123
1.- Materials i mètodes II	125
1.1.- Cultiu dels illots	125
1.2.- PCR a temps real	126

1.2.1.- Bases de la quantificació	127
1.2.2.- Disseny de l'experiment i optimització	132
1.2.3.- Controls i corbes patró	136
1.2.4.- Procediment: Amplificació de les mostres	137
1.2.5.- Interpretació dels resultats i càlculs	139
2.- Resultats II	141
2.1.- Regulació del contingut de mRNA d'IDS, amilina i perlecan als illots de ratolí.	
2.1.1.- Efecte de la glucosa i paper del metabolisme glicolític	141
2.1.2.- Efecte d'un inhibidor de la síntesi proteica (ciclohexamida)	146
2.1.3.- Efecte de la glucosa sobre l'estabilitat del mRNA (actinomicina)	148
2.2.- Regulació del contingut de mRNA d'IDS, amilina i perlecan en illots humans.	
2.2.1.- Efecte de la glucosa i paper del metabolisme glicolític	151
2.2.2.- Efecte d'un inhibidor de la síntesi proteica (ciclohexamida)	151
2.2.3.- Efecte de la glucosa sobre l'estabilitat del mRNA (actinomicina)	156
3.- Discussió II	159
OBJECTIU III	167
1.- Materials i mètodes III	169
1.1.- Constructes lentivirals	170
1.1.1.- Característiques dels vectors lentivirals	170
1.1.2.- Subclonatge del IDS en el vector pHR ¹ -CMV	172
1.1.3.- Producció de vectors lentivirals	173
1.1.4.- Titulació del lentivirus	176
1.2.- Infecció lentiviral	178
1.3.- Detecció per Western Blot	180
1.3.1.- Quantificació de proteïnes. Mètode de Bradford	181
1.3.2.- Transferència de les proteïnes a membrana de nitrocel·lulosa	182
1.3.3.- Immunodetecció	186
1.3.4.- Reutilització de les membranes	187
1.4.- Estudis de secreció	188

1.5.- Radioimmunoassaig d'insulina	190
1.6.- Estudi morfològic per microscòpia electrònica	192
1.6.1.- Fixació dels illots per Microscopi Electrònic	192
1.6.2.- Immunomicroscòpia electrònica	193
1.6.3.- Observació amb el microscopi electrònic	194
2.- Resultats III	197
2.1.- Expressió dels vectors lentivirals	197
2.1.1.- Expressió dels lentivirus als illots pancreàtics de ratolí	199
2.1.2.- Expressió dels lentivirus als illots pancreàtics humans	201
2.2.- Efecte de l'IDS sobre la funció secretora d'insulina als illots de ratolí	204
2.3.- Efecte de l'IDS sobre la morfologia dels illots pancreàtics humans	207
3.- Discussió III	211
CONCLUSIONS	217
BIBLIOGRAFIA	221
Publicacions derivades d'aquesta tesi	241

INTRODUCCIÓ

1.- L'ILLOT PANCREÀTIC

1.1.- ANATOMIA I ORGANITZACIÓ DE L'ILLOT PANCREÀTIC

Tipus cel·lulars endocrins a l'illot

Els illots de Langerhans són agrupacions de cèl·lules endocrines que es troben dispersades per tot el pàncreas (majoritàriament a la cua). El número d'illots per pàncreas oscil·la de 100.000 a 2.500.000 i la mida varia de 50 a 300 μm de diàmetre. Cada illot està compost de quatre tipus cel·lulars endocrins principals, els quals es distingeixen en base a les seves característiques histològiques, morfològiques, tintorials, immunohistoquímiques i funcionals. Les cèl·lules β productores d'insulina, les cèl·lules α productores de glucagó, les cèl·lules δ productores de somatostatina i les cèl·lules secretores del polipèptid pancreàtic, les quals es troben en una proporció de 68:20:10:2% respectivament.

La disposició de les cèl·lules endocrines a l'illot no és a l'atzar sinó que respon a una organització altament estructurada. Als illots de rosegadors i menys obvi als illots humans, les cèl·lules β productores d'insulina ocupen la part central de l'illot i suposen més del 60% del seu volum total; al voltant es distribueixen les cèl·lules α , les cèl·lules δ i les cèl·lules productores del polipèptid pancreàtic. A l'home, les cèl·lules α es troben dispersades per tot l'illot (1).

L'illot també conté vasos sanguinis i fibres nervioses. Tots aquests components, estan envoltats per una fina càpsula de fibres de col·lagen que separa l'illot de l'exocrí, tot i que moltes vegades es troba absent.

Vascularització

L'illot està altament vascularitzat rebent una aportació directa de sang arteriolar (2). Un 10-20% del flux sanguini pancreàtic total es dirigeix directament als illots (els quals tan sols constitueixen del 2 al 3% del volum del pàncreas). Els factors que regulen el flux sanguini a l'illot, poden afectar la secreció hormonal d'aquest. Així doncs, s'ha demostrat que altes concentracions de glucosa augmenten el flux sanguini pancreàtic i preferentment augmenten el flux sanguini pancreàtic a l'illot (3). L'estructura vascular de l'illot és de tipus glomerular. Als illots humans i als de rata, hi penetren d'una a tres arterioles aferents i allí es ramifiquen per constituir una extensa xarxa capil·lar. Els capil·lars de l'illot són finestrats i aquesta finestració disminueix o és absent als capil·lars que envolten el teixit exocrí. Aquest endoteli capil·lar finestrat permet el bescanvi ràpid de molècules de fins a 40 KDa. En la majoria dels casos, hi ha una làmina basal doble, una adjacent a l'endoteli i l'altra al parènquima insular, en les quals han de passar-hi els secretagogs i els productes secretors. Per tant, l'engruiximent d'aquesta làmina basal o el dipòsit d'amiloïd poden tenir conseqüències funcionals importants.

En base als estudis sobre la microvascularització als illots, s'ha postulat que, almenys en rata, existiria un sistema portal intransular. Segons el mateix, la sang irrigaria primer el nucli central de cèl·lules β on recolliria la insulina; després, corrent avall, irrigaria seqüencialment les cèl·lules α i les cèl·lules δ del mantell (4). Segons aquest model, la insulina podria regular la secreció de glucagó i somatostatina; i el glucagó a la vegada, podria regular la secreció de somatostatina. En canvi, la situació inversa, on la secreció d'insulina és influenciada per les altres dues hormones seria poc probable (5,6). No obstant això, les dades actuals no exclouen una regulació paracrina per simple difusió de les hormones a l'espai intersticial.

Inervació

El pàncreas està inervat per fibres d'origen simpàtic (procedents del gangli celiac) i parasimpàtic (procedents del nervi vagal). Les fibres nervioses segueixen les arterioles aferents, penetren dins l'illot i acaben prop de les cèl·lules endocrines insulars.

Aquest sistema nerviós autònom modula la secreció d'hormones a l'illot. L'estimulació colinèrgica provoca un augment de la secreció d'insulina, glucagó i polipèptid pancreàtic. Els seus estudis sobre la somatostatina són menys clars però semblen ser inhibitoris. L'estimulació β -adrenèrgica també provoca un augment a la secreció d'insulina i glucagó, polipèptid pancreàtic i en aquest cas de somatostatina. L'estimulació α -adrenèrgica disminueix la secreció d'insulina i somatostatina i l'efecte sobre la secreció de glucagó varia entre espècies. No es coneix els efectes de l'estimulació α -adrenèrgica sobre l'estimulació del polipèptid pancreàtic.

Es considera que la inervació simpàtica seria mitjancera de la resposta de l'illot a l'estrès, afavorint la hiperglucèmia i assegurant l'aportació adequada de glucosa al cervell.

1.2.- SECRECIÓ D'INSULINA

La insulina es sintetitza en forma de preproinsulina (7). La síntesi proteica comença al citosol. Quan ja s'ha sintetitzat uns 60 aminoàcids, el pèptid senyal (comprès als primers 25 aminoàcids) de la preproinsulina s'uneix a la partícula de reconeixement SRP que interacciona amb el seu receptor situat al reticle endoplasmàtic (RE). Mentre la traducció de la proteïna continua, aquesta s'internalitza cap a l'interior del RE a través d'un porus proteic. Aleshores, la

seqüència senyal és eliminada per una peptidasa i la proinsulina resultant s'allibera del ribosoma, el qual es desenganxa de la membrana del RE. La proinsulina és transportada, mitjançant vesícules, cap a la cisterna del *cis*-Golgi. D'allí viatja a través de tot el complex de Golgi fins arribar a la cisterna del *trans*-Golgi, on es formen els grànuls de secreció. Els grànuls de secreció immadurs els quals contenen la proinsulina presenten un embolcall de clatrina característic que aniran perdent en el procés de maduració. La secreció de proteïnes pot seguir dos camins diferents: una via regulada en resposta a una senyal positiva, com és el cas dels grànuls de secreció, o bé, una via constitutiva que suposa el moviment ràpid de proteïnes del sistema de Golgi a la membrana citoplasmàtica per a ser alliberades immediatament, com són les proteïnes destinades als lisosomes.

La conversió de proinsulina a insulina es dona dins dels grànuls secretors immadurs, de pH lleugerament àcid (8). Aquest ambient àcidic s'aconsegueix gràcies a una bomba de protons dependent d'ATP situada a la membrana del grànul (9,10). Els enzims proteolítics implicats són dos endopeptidases específiques (PC3 i PC2), que reconeixen senyals dibàsics d'aminoàcids, i la carboxipeptidasa H.

Cada cèl·lula β té centenars de canals de potassi sensibles a ATP (K^+ -ATP) i la seva activitat contribueix a un potencial de membrana al voltant de -70mV . En absència de glucosa, la relació ATP/ADP citoplasmàtica és baixa i els canals K^+ -ATP són actius. Quan la cèl·lula β s'exposa a glucosa, el metabolisme accelerat d'aquesta, porta a un augment citoplasmàtic de la relació ATP/ADP i al tancament dels canals de K^+ -ATP.

Quan aquests estan completament inhibits (>90%), la conductància dels canals de potassi sensibles a ATP romanent, és incapaç d'impedir la despolarització de la cèl·lula β . Quan aquesta despolarització és prou gran, els canals de calci dependents de voltatge s'activen de manera seqüencial. Al

començament de la despolarització, es dona l'obertura d'alguns canals de calci que fan que la despolarització sigui més gran i que d'altres canals de calci s'obrin. L'entrada d'ions de calci a l'interior cel·lular (associada a l'obertura de canals) provoca un augment a la concentració citoplasmàtica de calci (11) que culmina amb l'exocitosi de la insulina.

La identificació dels canals de K^+ sensibles a ATP com a responsables de la despolarització de la cèl·lula β induïda per glucosa, va portar al descobriment del mecanisme d'alliberament d'insulina en resposta a glucosa. La incapacitat de reproduir la resposta secretora d'insulina en presència de ionòfors de calci o sulfonilurees (enloc de glucosa), va fer pensar en la implicació d'algun altre mecanisme. Tot i que l'augment de la concentració de calci intracel·lular (Ca^{+2})i era semblant, l'estimulació de la cèl·lula β per glucosa sempre donava valors d'alliberació d'insulina més alts. A més, un augment del (Ca^{+2})i no reproduïa la resposta bifàsica induïda per glucosa.

Més endavant, es va descriure un nou mecanisme que no implica un augment del calci intracel·lular, tot i que només és efectiu amb concentracions de calci intracel·lulars elevades i actua conjuntament amb el mecanisme K^+ -ATP-dependent (12,13,14). Es coneix poc sobre les vies que hi estan implicades. De tota manera, sembla probable la implicació d'un augment del malonil CoA, una inhibició de la carnitin palmitoil transferasa I i una disminució de l'oxidació dels àcids grassos. Com a conseqüència, es produeix un augment citoplasmàtic de la concentració d'àcids grassos de cadena llarga que poden activar segons missatgers capaços d'estimular l'exocitosi (15,16,17).

Estudis més recents, han demostrat la capacitat secretora d'insulina, en resposta a glucosa, d'illots de rata que han estat prèviament depleccionats de calci extracel·lular i intracel·lular (18). Semblaria que l'augment de glucosa, juntament amb l'activació de les proteïna-quinases A i C, estimularien la secreció d'insulina sense necessitat d'un augment de Ca^{+2} intracel·lular (19).

El citoesquelet format per la interacció dels microtubuls (formats per tubulina polimeritzada) amb microfilaments és el responsable de la translocació dels grànuls de secreció cap a la perifèria cel·lular per ser alliberats mitjançant exocitosi (20). Tot el procés de secreció dels grànuls a la cèl·lula β es representa a la següent figura (21).

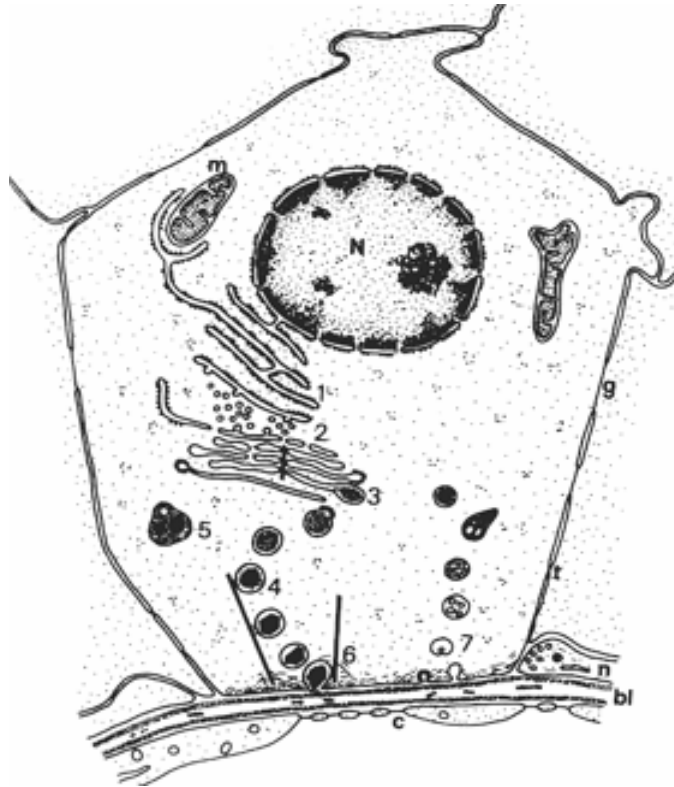


Figura 1.- Esquema del procés de secreció a la cèl·lula β de l'illot (1) Biosíntesi de la proinsulina té lloc al reticle endoplasmàtic rugós; (2) Es transfereix la proinsulina al complex de Golgi; (3) Conversió de proinsulina a insulina i emmagatzematge als grànuls que limiten la membrana; (4) Grànuls de secreció madurs; (5) Degradació dels grànuls per crinofagia; (6) Exocitosi dels grànuls mitjançant el sistema de microtubuls-microfilaments del citoesquelet; (7) Reciclatge de la membrana per endocitosi.

El control de l'emmagatzemat d'insulina a la cèl·lula β està controlat per tres processos: la biosíntesi d'insulina; la degradació d'insulina i la secreció d'insulina. Una alteració en algun d'aquest procés podria provocar un canvi en la producció d'insulina i per tant afectar l'homeostasi de glucosa. La degradació d'insulina és duta a terme pels lisosomes mitjançant un procés anomenat crinofàgia (es comenta més detalladament en el següent apartat).

1.3.- LISOSOMES I FUNCIÓ DE L'ILLOT PANCREÀTIC

1.3.1. BIOLOGIA DEL LISOSOMA

Els lisosomes són orgànuls citoplasmàtics limitats per una membrana que contenen una gran varietat d'enzims hidrolítics, que funcionen a pH àcid per a la digestió intracel·lular controlada de macromolècules.

El lisosoma fou descobert al 1955 per De Duve i col., a partir d'observacions bioquímiques, abans que fos visualitzat mitjançant tècniques de microscopia. En sotmetre homogenats de fetge a tractament que trencaven o solubilitzaven les membranes cel·lulars es trobaven amb una sèrie d'activitats hidrolítiques, com la fosfatasa àcida, tot indicant que aquests enzims estaven tancats en compartiments intracel·lulars. Per microscopia electrònica es va veure que aquests orgànuls cel·lulars estan limitats per una bicapa lipídica de 75 Å de gruix. La membrana lisosòmica està saturada de bombes de protons dependents d'ATP que assegurin el manteniment d'un pH baix, al voltant de 5, a l'interior de l'orgànul. La membrana és permeable a l'aigua i als productes finals de la digestió de les macromolècules, que surten a l'exterior del lisosoma per ser excretats o reutilitzats per la mateixa cèl·lula, però no és permeable als substrats o als productes intermitjos, i s'han identificat mecanismes transportadors específics per a la sortida d'alguns

metabòlits. Es coneix, també, una acetil-transferasa de membrana que catalitza l'entrada d'unitats acetil (concretament, per acetilar els grups glucosamina de l'heparan sulfat). L'estructura i les dimensions del lisosoma són molt variables d'un tipus cel·lular a un altre i, fins i tot, en una mateixa cèl·lula depenent del seu estat fisiològic.

Tot i la seva diversitat anatòmica, els lisosomes es classifiquen en dues categories: els lisosomes primaris, són vesícules originades per gemmació en el trans-Golgi i en el seu interior contenen enzims hidrolítics per a la digestió controlada de macromolècules, i els lisosomes secundaris, els quals resulten de la fusió de vesícules que contenen substrats a digerir amb lisosomes primaris, aquests lisosomes contenen enzims i substrats amb diferents estats de degradació (veure Figura 2).

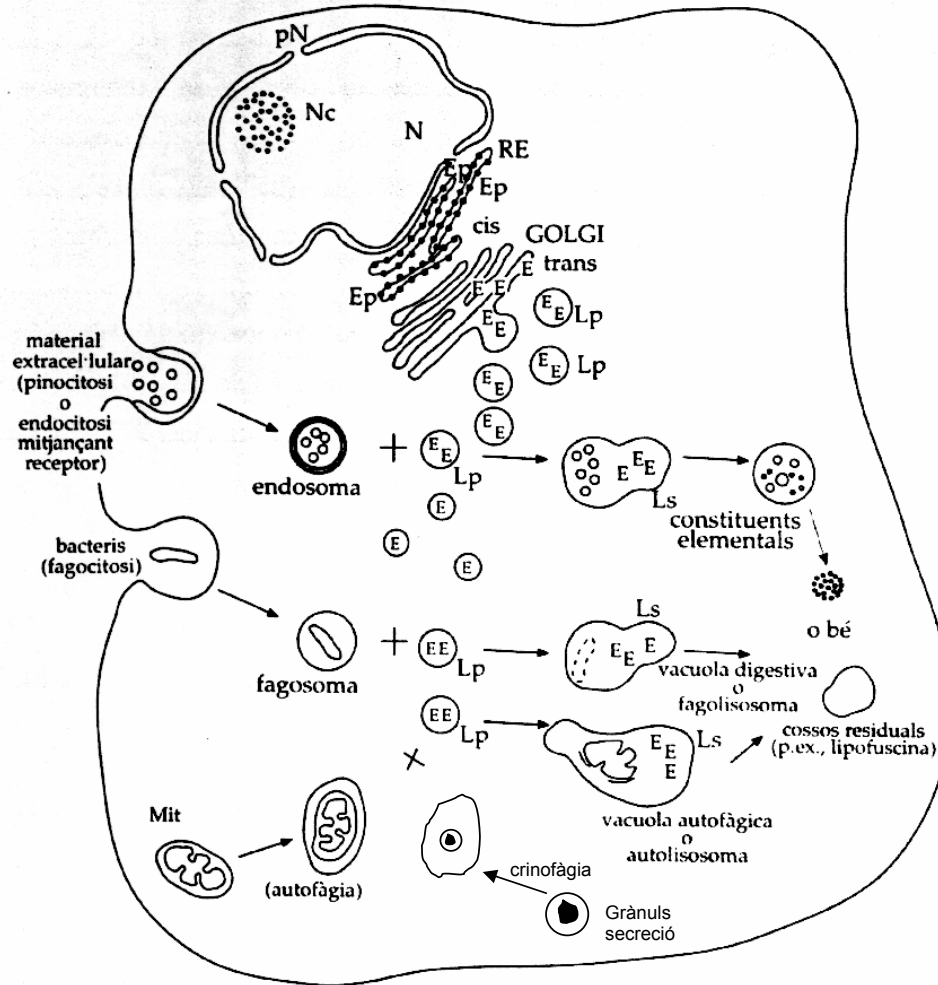


Figura 2.- Biologia del lisosoma. Els lisosomes són orgànuls citoplasmàtics envoltats de membrana que contenen una gran varietat d'enzims hidrolítics (E), que funcionen a pH àcid i que són capaços de digerir macromolècules biològiques. Els materials extracel·lulars són captats per processos d'endocitosis (pinocitosis, endocitosis mitjançant receptor i fagocitosis), i els intracel·lulars, per autofàgia. Els lisosomes primaris (Lp) s'originen per gemmació al trans-Golgi i porten incorporats els enzims (E) que s'han sintetitzat als ribosomes del reticle endoplasmàtic (RE). Els lisosomes secundaris (Ls) es formen degut a la fusió entre els lisosomes primaris (Lp) i els substrats captats per endocitosis o autofàgia. N, nucli; Nc, nucleol; pN, porus nuclear; Mit, mitocòndria. Segons Chabás i col. (22).

1.3.2.- EL LISOSOMA A L'ILLOT PANCREÀTIC

La fusió dels grànuls secretors amb els lisosomes es considera que és una funció específica dels lisosomes. A aquest procés, en el qual es degrada la insulina intracel·lular dels illots, es va denominar crinofàgia i fou descrit el 1969 per de Duve i col. (23).

La morfologia lisosomal del illots pot ser afectada per la concentració extracel·lular de glucosa (24). De manera que, quan es varen cultivar illots de ratolí durant una setmana a alta concentració de glucosa (28 mM), mostraven uns nivells alts tant en la biosíntesi com en la secreció d'insulina, i al mateix temps, s'observà que la mida dels lisosomes disminuïa, tot i que augmentava tant la densitat com el número de lisosomes presents, principalment lisosomes primaris (25). En canvi, quan els illots eren cultivats a 3,3 mM de glucosa, els lisosomes augmentaven de mida i disminuïa la biosíntesi i la secreció d'insulina. Aquest fet suggereix que la baixa secreció d'insulina provoca l'estimulació de la crinofàgia.

Per tant, sembla que existeix una relació entre la morfologia dels lisosomes i la biosíntesi i secreció d'insulina. A fi d'estudiar si la glucosa interferia directa o indirectament en la morfologia dels lisosomes, es varen cultivar durant una setmana illots a 3,3 i 28 mM de glucosa i s'analitzaren les dues condicions a alta i baixa secreció d'insulina (26). Els resultats mostraren que independentment a la concentració en que s'havien cultivat els illots, la degradació intracel·lular d'insulina augmentava significativament en les condicions de baixa secreció, on predominava la població de lisosomes secundaris. Això suggereix que la glucosa no interfereix directament sobre el procés de crinofàgia, sinó que afecta a la degradació intracel·lular d'insulina, provocant un canvi en el balanç entre biosíntesi i secreció d'insulina. I l'activitat crinofàgica està relacionada amb el contingut dels grànuls de secreció de la cèl·lula β (26).

La població lisosomal a la cèl·lula beta *in vivo* és principalment de lisosomes secundaris, contenint grànuls secretors. Canvis sobtats de concentració de glucosa al medi, provoquen una resposta a curt termini dels mecanismes de secreció i biosíntesi de la insulina. Mentre que les transformacions lisosomals produïdes a la cèl·lula β , semblen estar involucrades amb una adaptació a llarg termini com a resposta a les variacions produïdes a la cèl·lula β (27).

Tots aquests resultats afavoreixen la idea que la crinofàgia juntament amb la biosíntesi i secreció d'insulina, podrien tenir una importància fisiològica pel control del contingut dels grànuls secretors a la cèl·lula β . I la crinofàgia seria un mecanisme per tal d'evitar l'acumulació dels grànuls secretors.

La població lisosomal depèn de tres processos fonamentals (28): la formació de lisosomes primaris, que augmenta quan la biosíntesi de proteïnes és estimulada; la transformació de lisosomes primaris a lisosomes secundaris, per la fusió amb autofagosomes, heterofagosomes o grànuls secretors i la degradació i/o dissipació dels lisosomes secundaris.

2.- DIPÒSITS D'AMILOID

2.1.- DESCRIPCIÓ

Historia i terminologia

A començaments d'aquest segle, Opie (29,30) va descriure canvis patològics ("hialinosis") als illots pancreàtics de pacients que havien mort de complicacions diabètiques. Mig segle després, Ehrlich i Rattner (31) demostraren que les lesions hialines descrites per Opie tenien les propietats histoquímiques característiques dels dipòsits d'amiloid després de tenyir-les amb el colorant vermell de Congo. Més tard, Westermark i col·laboradors (32) purificaren i seqüenciaren parcialment el pèptid component majoritari de l'amiloid d'un insulinoma. Al 1987, Cooper i col·laboradors (33) varen caracteritzar el nou pèptid (amilina) en extractes de teixit pancreàtic ric en amiloid i que provenia de pacients amb DM tipus 2. Estudis posteriors han demostrat la presència d'aquest pèptid en teixit pancreàtic d'individus sans i en tots els animals estudiats: mico, gos, gat, hámster, rata, ratolí, conillet d'Índies (34).

La terminologia emprada per descriure el mateix pèptid ha estat molt variada: "Diabetes Associated Peptide" (DAP), "Insulinoma Amyloid Polypeptide" (IAP), "Islet Amyloid polypeptide" (IAPP) i Amylin. Actualment es mantenen els d'amilina i IAPP.

Definició general d'amiloid

Amiloid o també anomenat amiloidosis és un terme general que descriu dipòsits extracel·lulars de proteïnes d'estructura fibril·lar en òrgans i teixits (35).

Tots els dipòsits d'amiloid, independentment de la proteïna fibril·lar específica que es diposita, comparteixen les següents propietats:

- Les molècules proteiques presenten una estructura secundària de plegament en làmina β (36). Els pèptids es mantenen units transversalment mitjançant enllaços d'hidrogen.
- Tenen una estructura quaternària fibril·lar amb una aparença típica al microscopi electrònic (37,38). La substància amiloid està constituïda per agregats fibril·lars rígids, lineals, no ramificats, de 7-10 nm de diàmetre i de longitud variable.
- Birefrigència verda sota llum polaritzada després de la tinció amb el Vermell de Congo.
- Insolubilitat elevada en medi fisiològic.
- Resistència a digestió proteolítica.
- Presència d'altres components: com la glicoproteïna anomenada component P, que també pot ser detectada circulant en plasma (SAP: "serum amyloid protein") (39) i glicosaminoglicans, especialment heparan sulfat proteoglicà (perlecan).

El component P humà està relacionat amb la proteïna C reactiva de fase aguda i pot unir-se a qualsevol tipus de fibra de substància amiloide (40). Estudis *in vitro* han demostrat que la unió d'aquesta glicoproteïna al dipòsit d'amiloid protegeix les fibres de degradació proteolítica, mentre que estudis en ratolins en els que el gen codificant pel component P ha sigut inactivat, han mostrat un retard en l'inici de l'amiloidogènesis i una menor severitat del procés (41).

La classificació dels diferents dipòsits d'amiloid depèn de la proteïna precursora de la formació de les fibretes (42) (Taula 1).

L'amiloid pancreàtic, constituït per l'amilina, forma part de les anomenades amiloidosis localitzades, que es donen en òrgans concrets i estan relacionades amb un síndrome clínic, en aquest cas amb la diabetis tipus 2. També formen part d'aquest tipus d'amiloids els formats a la malaltia d'Alzheimer, constituïts per la proteïna amiloid beta ($A\beta$) (43).

La importància clínica dels dipòsits d'amiloid esdevé quan l'acumulació, per la seva mida o localització, arriba a interferir amb la funció normal del teixit o òrgan on es troben.

AMILOID	PROTEÏNA (POLIPÈPTID)	MALALTIA ASSOCIADA
AA	Proteïna A del amiloid (SAA)	Amiloidosis AA (enfermetat inflamatoria)
$A\beta$ β amiloid	Proteïna amiloid β ($A\beta$)	Malaltia d'Alzheimer Síndrome de Down
A Endocrí	Procalcitonina	Carcinoma medul-lar de tiroide
AIAPP	Amilina (IAPP)	Diabetis Mellitus tipus 2
AF	Prealbumina	Polineuropatia familiar A
AL	Kappa / lambda	Multiple mieloma
ATTR	Transtiretina	Senil sisitematic cardiac
HA	Beta 2 Microglobulina	Diàlisis
HCCAA	Cistatina-C	Angiopatia
Prió amiloid	PrP ^{SC}	Prions

Taula 1.- Classificació d'amiloids.

2.2.- COMPONENTS DEL DIPÒSIT D'AMILOID

Com s'ha comentat anteriorment, el principal component del dipòsit d'amiloid descrit en DM tipus 2, és l'amilina, tot i que no és l'únic, altres components com l'apolipoproteïna E (apo E) i l'heparan sulfat proteoglicà, perlecan també formen part de l'amiloid.

Amilina

L'amilina és un pèptid de 37 aminoàcids (Figura 3) amb un pes molecular de 3905 Da. Aquesta hormona peptídica es sintetitza i es plega a l'aparell de Golgi i es cosecreta amb la insulina als grànuls secretors de la cèl·lula β de l'illot pancreàtic (44), en resposta al mateixos estímuls secretagogs, com a altes concentracions de glucosa (45). Presenta un 45% d'homologia estructural amb els neuropèptids CGRP-1 i CGRP-2 ("Calcitonin Gene Related Peptides") produïts per les cèl·lules C de la glàndula tiroide. Concretament es diferencien en la regió que comprèn els aminoàcids de la posició 20-29, que sembla ser crítica en la patogènesis de l'amiloid (46).

El gen de l'amilina és un gen de còpia única localitzat en el braç curt del cromosoma 12, regió p13.3-12.1. Conté tres exons, dels quals dos són els que codifiquen per la preproamilina completa (47).

El pèptid precursor, preproamilina, conté 89 aminoàcids en l'home i 93 en rata (48,49). Mentre que els residus 1-37 presenten un alt grau de conservació entre les diferents espècies, els propèptids amino i carboxiterminal presenten un major grau de variabilitat, la qual cosa indica que probablement manquen d'activitat biològica. La preproamilina es converteix en proamilina per pèrdua del pèptid senyal (22 aminoàcids) al reticle endoplasmàtic. La conversió de proamilina a pèptid madur implica la proteòlisi de la molècula en els senyals dibàsics lisina-arginina, amb la

pèrdua dels propèptids aminoterminal (11 aminoàcids) i carboxiterminal (19 aminoàcids), i la formació d'un pont disulfur entre els residus de cisteïna 2 i 7.

El fet que l'amilina estigui colocalitzada amb la insulina als grànuls de les cèl·lules β i que la proinsulina humana estigui processada per l'acció combinada de PC2 i PC3 (50), suggereix que aquestes endopeptidases podrien ser responsables també del processament de la proamilina. Estudis *in vitro* amb oòcits de *Xenopus* han demostrat que la convertasa PC2, però no la PC3 o la furina, estaria implicada en la maduració de la proamilina humana (51). En aquest sentit, un estudi recent realitzat en ratolins que patien una pèrdua del gen PC2, varen observar un increment dels nivells de la proamilina amb la regió N-terminal intacte (52).

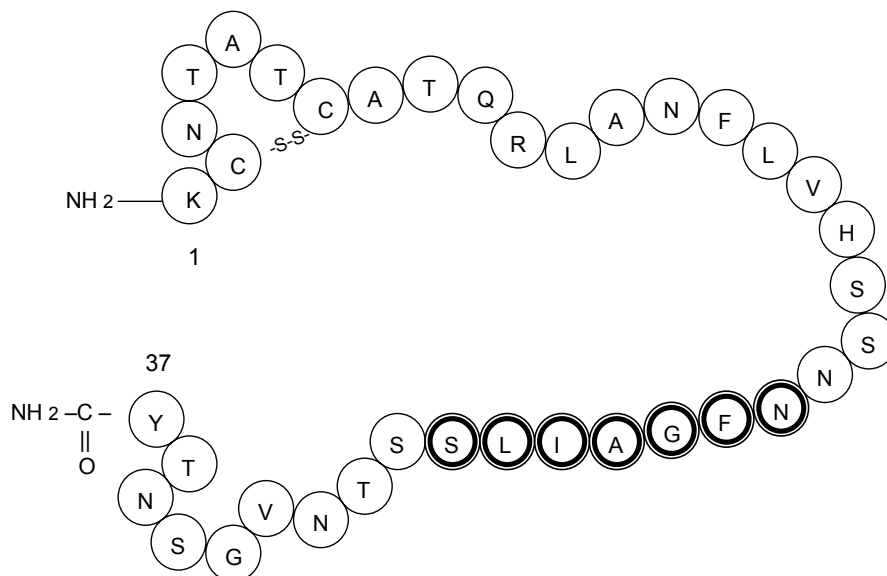


Figura 3.- Estructura primària de l'amilina humana.

S'han representat els aminoàcids més crítics, per a la fibril·logènesi de la molècula, en un doble cercle.

L'amilina es secreta per les cèl·lules β del illot pancreàtic i es converteix en dipòsits d'amiloid en la DM tipus 2. La conversió del monomer soluble (amilina 1-37) a fibretes insolubles que adopten l'estructura de fulla β involucra canvis en la conformació molecular, en la bioquímica cel·lular i en factors relacionats amb la diabetis (53). La capacitat amiloidogènica de l'amilina depèn en mesura, de les regions amiloidogèniques que conté la seqüència primària del pèptid madur (Figura 4). És per aquesta raó, que no totes les molècules d'amilina conegudes tenen la capacitat d'agregar-se i formar dipòsits. Mentre que humans, primats (54) i felins (55) són capaços de desenvolupar dipòsits d'amiloid, altres espècies, com els rosegadors no ho són. Aquesta diferència és deguda a les variacions d'aminoàcids en la porció central de la molècula 20-29. Estudis on s'han realitzat diverses substitucions d'aminoàcids d'aquesta regió per prolina, en rosegadors i altres espècies, demostren que s'inhibeix la formació de fibres d'amilod (46,56).

Fins fa relativament poc temps, la única regió amiloidogènica proposada era la que comprenia els residus 20-29 (57-59) i semblava ser la única regió del pèptid que podia adquirir la conformació de làmina β . Estudis recents però, han identificat dos nous dominis amiloidogenics. La regió d'amilina carboxiterminal que comprèn els residus 30-37, que és capaç de formar fibretes d'amiloid en medi aquós (60) i el fragment del pèptid 8-20, que també pot adoptar la conformació de làmina β (61). Aquestes dues seqüències a part de ser potencialment amiloidogèniques tenen una gran importància en el plegament de l'amilina. La regió 8-20 de l'amilina de rosegadors conté un únic aminoàcid substituït, His18Arg, en comparació amb la seqüència humana, el qual sembla que no afecta la formació de fibretes en aquesta regió. El domini 30-37 és altament conservat entre les diferents espècies i per tant, també en rosegadors forma fibretes. D'aquesta manera els rosegadors també contenen en la molècula d'amilina dues regions potencialment amiloidogèniques

però no arriba a adoptar l'estructura de làmina β degut al domini ric en prolines de la regió 20-29, que evita aquesta conformació. Sembla que interaccions entre múltiples dominis d'estructura en làmina β estarien involucrades en la fibril·logènesi de l'amilina.

	N-IAPP	IAPP				C-IAPP
		1	20	29	37	
Home	TPIES:::HQVEKR	KCNTATCATQRLANFLVHSSN NFGAILS SSTNVGSNTY				GKRNAVEVLKREPLNYLPL
Simi	-----:::-----	-----R-----T-----D--				-----
Gat	-----:::N-----	-----IR-----L-----P-----				---ST-DI-N-----F
Gos	---K-:::N-----	-----R-----L-----P-----				----T I - I - N - G -----
Rata	--VG-GTNP--D--	-----R-----L-PV-PP-----				----VA-DPN-S-DF-L-
Ratolí	--VR-GSNP-MD--	-----R-----L-PV-PP-----				----AGDPN-S-DF-KV
Hàmster	--VR-GTN--MD--	-----N-L-PV-P-----				---S-A-IPDGDS-DLFL-
Guinea	-S-A-DTG--G--	-----T-----R--H-L-A-LP-D-----				-----PQISD-LCH----
Cobai	---A-DTD-R-D--	-----T-----R--H-L-A-PP-K-----				-R---:QVDV-L-H----

Figura 4.- Comparació de la seqüència d'aminoàcids de la proamilina de diversos mamífers. (:) indica que s'ha perdut l'aminoàcid, (-) indica els residus que són idèntics als humans. Es pot observar la presència de prolines en la regió 20-29 de l'amilina, en les espècies de rosegadors, les quals eviten la formació de fibretes.

S'ha estudiat que el pèptid NFGAIL contingut en la regió 20-29 és suficient per a la conformació en làmina β i les fibretes formades tenen la morfologia típica de l'amiloid (62). En un estudi posterior de mateixa regió 20-29, s'analitzaren diferents hexapèptids a fi d'estudiar la capacitat d'aquests pèptids per interaccionar amb l'amilina i modular la via d'agregació. Varen identificar dos pèptids SNNFGA i GAILSS que eren capaços d'inhibir la formació de fibretes *in vitro* (63). En aquest sentit, el mateix grup en un estudi recent ha identificat dues regions internes de

l'amilina en el domini 8-20, FLVHSS i LANFLV, les quals tenen un paper potenciador tant en el plegament com en l'agregació de l'amilina humana (64).

No obstant això, l'estructura primària de l'amilina no és suficient per a explicar la seva capacitat amiloidogènica. Cal tenir en compte que la formació d'amiloid en individus no diabètics és molt poc freqüent.

Apolipoproteïna E

L'apo E és una proteïna d'origen hepàtic que s'expressa en la superfície de les lipoproteïnes riques en triglicèrids: quilomicrons, VLDL, IDL i LDL. Té un paper important en l'aclariment de les lipoproteïnes aterogèniques remanents en l'espai vascular unint-se al receptor LDL i LRP ("LDL receptor related protein"), i en el transport revers del colesterol, fora de la paret arterial (65).

El gen humà de l'apo E és polimòrfic, s'han identificat tres al·lels diferents ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$) en el locus de l'apo E ubicat en el cromosoma 19, codificant per tres isoformes diferents (apo E2, apo E3 i apo E4), que donen lloc a sis fenotips diferents (66). En població caucàsica, les freqüències dels al·lels $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$ són 8%, 77% i 15%, respectivament. L'homozigosi per la isoforma apo E2 està associada amb un augment en plasma de la concentració de IDL i en el desenvolupament d'aterosclerosi prematura (67). Actualment es considera que els polimorfismes de l'apo E constitueixen un dels més importants determinants genètics de la coronariopatia isquèmica en la població en general, conferint l'isoforma E4 un risc incrementat en la malaltia coronària (68).

L'apo E constitueix un component fonamental de les plaques senils i de les estructures neurofibril·lars detectades en el cervell de pacients amb la malaltia d'Alzheimer (69). Investigacions recents han demostrat que la presència de l'al·lel $\epsilon 4$ s'associa a un risc incrementat de presentació de formes esporàdiques i familiars

de la malaltia (70,71). De forma anàloga, s'ha detectat per immunocitoquímica la presència d'apo E formant part dels dipòsits d'amiloid en illots pancreàtics (72,73), però en aquests estudis no s'ha detectat la presència del mRNA de l'apo E, suggerint que el lloc de síntesi de l'apo E és extrapancreàtic (73,74). L'origen més probable de l'apo E present en els illots pancreàtics és el fetge, que és el principal lloc de síntesi d'aquesta proteïna, o bé, els macròfags circulants a través de l'illot (75). En canvi, en la malaltia d'Alzheimer, sí que s'ha detectat abundant mRNA d'apo E en els astròcits (76).

El paper potencial de l'apo E en l'amiloidogènesi dels illots no està del tot clar. Estudis sobre la formació d'amiloid en la malaltia d'Alzheimer suggereixen que l'apo E pot promoure la fibril·logènesi i sembla que estabilitza les fibretes d'amiloid formades a partir de la proteïna amiloid β ($A\beta$) (77-79). Experiments amb models de ratolins transgènics que expressen l'amiloid β però que no expressen l'apo E, han demostrat que desenvolupen amiloïdosis en la regió de l'hipocamp més lentament que ratolins transgènics que presenten una expressió normal de l'apo E (80). Basant-se en aquests estudis, s'ha hipotetitzat que l'apo E també podria participar en els dipòsits d'amiloid detectats en els illots pancreàtics. No obstant, els estudis desenvolupats en aquest sentit, han estat negatius. Estudis genètics no han demostrat l'associació de l'al·lel E4 amb una major freqüència o severitat de l'amiloidosis en els illots de pacients amb diabetis tipus 2 (81). D'altra banda, experiments amb models de ratolins transgènics que sobreexpressen l'amilina humana però que són deficitaris en apo E, es detectà també la formació de dipòsits d'amiloid, per tant, l'apo E no es requereix per l'amiloidogènesi en la diabetis tipus 2, en contra amb el que paper que adopta l'apo E en la malaltia d'Alzheimer (82).

Perlecan

El perlecan és un heparan sulfat que forma part de la família dels proteoglicans i és el principal component de la membrana basal de les cèl·lules endotelials (83). S'ha detectat el perlecan en els dipòsits d'amiloid de l'illot pancreàtic (84) i en altres amiloids, com els formats en la malaltia d'Alzheimer (85), on s'ha observat que el perlecan estimula la deposició de fibres d'amiloid de la proteïna A β , estableix els agregats neurofibril·lars i preveu la degradació de l'amiloid (86,87). Els proteoglicans tenen la capacitat d'alterar l'estructura de la proteïna precursora amiloidogènica d'estructura *random coil*, la qual és soluble, a la conformació de làmina β , prerequisite per formar l'amiloid (88).

Proteïnes amiloidogèniques, com l'amilina, contenen una seqüència consens on s'hi uneixen les cadenes de glicosaminoglicans (GAG) del perlecan (89), concretament, s'ha identificat a la regió N-terminal de la pro-amilina un domini d'unió amb l'heparina (90). Aquesta unió protegeix la molècula de la digestió d'heparanases, suggerint la formació d'un complex extremadament estable i donant aquesta estabilitat al dipòsit d'amiloid (91).

Tot i que el paper exacte del perlecan en l'amiloid no es coneix, existeixen evidències a favor d'un paper potencial del perlecan en la formació dels dipòsits d'amiloid en els illots pancreàtics de pacients amb diabetis tipus 2, on s'ha demostrat en experiments *in vitro*, que les cadenes de glicosaminoglicans del perlecan constitueixen la malla on precipiten les molècules d'amilina, promovent la formació d'agregats fibril·lars i, finalment, conduint a l'aparició dels dipòsits d'amiloid (92).

Estudis de *Northern* i *Western blot* en illots de ratolí isolats, han detectat la presència del mRNA del perlecan i la proteïna (73). D'altra banda, estudis d'immunohistoquímica han demostrat que el perlecan es presenta de forma normal a les cèl·lules beta de l'illot (74). En un estudi recent han detectat que la línia cel·lular β TC3 sintetitza i secreta heparan sulfat proteoglicans i a més, aquests

proteoglicans són capaços d'unir-se específicament en les fibretes d'amilina (93), per tant, tots aquests estudis suggereixen un possible paper del perlecan en la formació de l'amiloid de l'illot en la diabetis tipus 2.

2.3.- LOCALITZACIÓ I INICI DE L'AMILOID

Una qüestió llargament debatuda en el procés d'amiloidosi dels illots en la diabetis tipus 2 és, si la formació de fibril·les comença intracel·lularment, o bé, aquest procés s'inicia un cop l'amilina és secretada per la cèl·lula, i per tant la formació de dipòsits seria extracel·lular.

Formació de fibretes en l'espai extracel·lular

La formació espontània dels dipòsits d'amiloid associats amb la diabetis en humans, micos i gats es dona majoritàriament en l'espai extracel·lular del illot i són visibles per microscopia dins de l'illot (94,95,96). No obstant, s'han identificat per microscòpic electrònic, petits dipòsits adjacents als capil·lars dels illots, fet que suggereix que a part dels dipòsits patològics, poden estar presents a l'inici de la malaltia aquests dipòsits adjacents als capil·lars que s'expandeixen i impacten en la funcionalitat de l'illot (53). L'expansió dels dipòsits duu com a conseqüència la progressiva deposició d'amilina, d'aquesta manera la massa fibrilar s'expandeix fins a l'espai de l'illot ocupant l'àrea on es troben les cèl·lules endocrines. Per tant, la progressiva deposició d'amiloid està associada amb una destrucció i reemplaçament dels illots cel·lulars tant en humans com en models animals (54,97,98).

La formació dels dipòsits d'amiloid està associada amb un augment de la producció d'amilina (99-101). Si es considera que l'augment de la secreció, o bé, la

disminució de l'eliminació d'amilina, és un factor causal per la formació de les fibretes, seria d'esperar que l'acumulació es donés a l'espai extracel·lular, dins del domini de l'illot.

El canvi de conformació de l'amilina s'accelera en presència de fibretes preformades (102) o d'un nucli (103,104). Aquests estudis suggereixen que *in vivo*, un cop s'ha format el nucli fibril·lar extracel·lular dins de l'espai del illot, l'amilina secretada per la cèl·lula β , pot ser ràpidament transformada en conformació β al lloc de nucleació i unida amb les fibretes. No està clar de que està format aquest nucli, però podria contenir agregats insolubles (no necessàriament en conformació β) de fragments d'amilina o pro-amilina, els quals han estat identificats a extractes de pàncreas humà i a plasma (105).

Formació de fibretes intracel·lulars

En els grànuls de cèl·lula β de ratolins transgènics que expressen amilina humana, s'ha descrit un tipus de material fibril·lar que s'hauria format abans de la secreció del pèptid (106). Tot i així, encara cal confirmar si aquests petits acúmul només observats per microscopia electrònica, tenen les característiques d'amiloid (birefringència amb vermell del Congo).

S'han detectat fibretes d'amilina intracel·lulars a orgànuls no identificats del citoplasma d'algunes cèl·lules, especialment les d'insulinoma humà (107). També, s'ha observat la formació de fibretes intracel·lulars a ratolins transgènics que expressen l'amilina humana (hIAPP) (108), a illots humans transplantats (109) i a amiloïdosis massiva associada amb diabetis als ratolins transgènics (hIAPP) tractats amb esteroides (97). Algunes fibretes intracel·lulars mostren immunoreactivitat per la regió aminoterminal de la proamilina (109). El component peptídic de les fibretes intracel·lulars sembla ser la proamilina o un intermediari, a

més, aquestes fibretes s'han localitzat a la regió pre-Golgi de la via de secreció, possiblement al reticle endoplasmàtic.

L'acumulació intracel·lular de fibretes, ha estat estudiada a cèl·lules COS-1 transfectades amb el gen de l'amilina humana (110,111). Els constructes de DNA utilitzats, transcriuen per l'amilina humana, de rata o per la forma mutant de l'amilina (S20G). S'observà que l'amilina s'acumulava al reticle endoplasmàtic i a l'aparell de Golgi i augmentava l'apoptosi. L'acumulació al reticle endoplasmàtic i Golgi de productes genètics transfectats a la cèl·lula, suggereix que el pèptid no s'ha processat correctament en la via constitutiva de secreció a les cèl·lules COS. Això podria estar relacionat amb la detecció de proamilina a les fibretes i a la manca de les endopeptidases PC1 o PC2, necessàries pel processament de l'amilina (112).

Acumulacions intracel·lulars de material immunoreactiu per l'amilina, tot i que no necessàriament en forma de fibretes, s'ha identificat als lisosomes de cèl·lules β , tant en humans diabètics com no diabètics (113), i a ratolins transgènics que expressen l'amilina humana (108). Aquesta acumulació d'amilina lisosomal procedeix del procés de crinofàgia, on els components del grànul secretor són reciclats dins la cèl·lula a través de la via de degradació lisosomal (114). Els enzims lisosomals degraden l'amilina humana menys eficientment que l'amilina de rosegadors o la insulina. Per tant, un augment de la concentració d'amilina als lisosomes és una font potencial per a la formació de fibretes intracel·lulars.

2.4.- MECANISMES DE FORMACIÓ DE L'AMILOID

Com s'ha indicat anteriorment, l'estructura primària de l'amilina és un factor imprescindible però no suficient per a la formació dels dipòsits d'amiloid associats a la diabetis. S'han proposat tres possibles mecanismes de formació de l'amiloid:

Hipersecreció d'amilina

Un augment de la producció i secreció d'amilina associat amb un increment de la demanda d'insulina, podria ser determinant per l'acumulació i agregació d'amilina. No obstant, la infreqüent detecció de dipòsits d'amiloid en individus no diabètics obesos i/o que presenten resistència a la insulina, per tant, hipersecretors d'amilina (74), ens indica que el simple augment de la secreció d'amilina no és suficient per a la formació dels agregats.

Diversos grups han desenvolupat models de ratolins transgènics que sobreexpressen amilina humana a la cèl·lula β pancreàtica, amb la finalitat de comprovar l'esmentada hipòtesi. Els resultats però, no són massa positius, ja que mentre en certs models animals sí que s'observa la formació de dipòsits d'amiloid associats amb la mort de cèl·lula β i el desenvolupament d'hiperglicèmia (100,115), el desenvolupament d'aquests amiloids està condicionat a certs factors com: una predisposició genètica o factors ambientals, com l'administració de glucocorticoids, una dieta rica en greixos o a una genètica característica d'obesitat i hiperlipidèmica com són els ratolins ob/ob (98,100,115). En un estudi recent, han demostrat que l'administració de dieta rica en greixos a ratolins transgènics (hIAPP), provoca un augment de la prevalença i la severitat dels dipòsits d'amiloid (116). És ben conegut que tots aquests factors afecten a la funció de la cèl·lula β . Per tant, tot i que la sobreexpressió d'amilina és un factor important, calen altres condicions per la formació de dipòsits d'amiloid a la diabetis tipus 2.

Alteracions genètiques de l'amilina

El segon mecanisme possible per a la formació d'amiloid, és que mutacions en el gen d'amilina podrien facilitar el procés d'agregació degut a una alteració en l'estructura de la proteïna. En aquest sentit, estudis en població japonesa van detectar la presència de la mutació S20G a l'exó 3 del gen de l'amilina en un 4,1% de pacients amb diabetis tipus 2, associant-se aquesta mutació a un patró fenotípic específic: edat de diagnòstic relativament jove, tendència a la insulinoènia i a l'agregació familiar de diabetis (110). Estudis realitzats pel nostre grup d'investigació han identificat una nova mutació a la regió promotora del gen de l'amilina, la qual comporta un canvi nucleotídic de G a A en la posició -132, associada a un augment de l'activitat transcripcional de l'amilina. La seva freqüència és del 9,7% en població diabètica i del 1,5% en població control (117). En la mateixa línia d'investigació, també s'ha detectat a l'intró 2 del gen de l'amilina un polimorfisme associat a concentracions plasmàtiques més baixes de colesterol LDL a pacients amb diabetis tipus 2 i a controls en relació a subjectes no portadors del polimorfisme (118).

Tot i així altres estudis han aportat proves negatives sobre l'existència de mutacions del gen de l'amilina associades amb la diabetis tipus 2 que afectin l'estructura de l'amilina (119).

Per tant, sembla que mutacions en el gen de l'amilina no poden explicar la formació de la majoria de dipòsits d'amiloid associats amb la diabetis tipus 2, tot i que podrien contribuir en certs pacients (120).

Alteracions del processament de l'amilina

Un altre mecanisme proposat per a la formació dels dipòsits d'amiloid és un mal funcionament del processament de l'amilina que provocaria la secreció de formes immadures de l'amilina.

Tant la proinsulina com la proamilina són processades en paral·lel pels enzims prohormones convertases, PC2 i PC3, i per la carboxipeptidasa E, als grànuls secretors (112,121,122). El processament de la proamilina podria estar afectat pel mateix mecanisme que afecta la proteòlisi de la proinsulina en la diabetis tipus 2 i això, provocaria una hipersecreció del precursor de la insulina i l'amilina. S'ha observat que en ratolins transgènics que no expressaven el gen PC2, secreten la proamilina sense haver sigut processada (123). D'altra banda, estudis recents, han demostrat que en illots humans cultivats a alta concentració de glucosa augmentava la proporció de proinsulina i proamilina secretada (124). A més a més, estudis *in vitro* també han detectat una alteració del processament de la insulina quan els illots eren cultivats amb àcids grassos (125).

Per altra banda, s'ha observat immunoreactivitat per la regió aminoterminal de la proamilina a dipòsits d'amiloid (126,127). Estudis recents han detectat que a la regió N-terminal de la proamila conté un domini d'unió per l'heparan sulfat (90), el qual també forma part dels dipòsits d'amiloid.

Per tant, tots aquest resultats porten a suggerir que en condicions de hiperglicèmia i/o hiperlipidèmia associades amb la diabetis tipus 2, es pot donar una alteració del processament de la proamilina que provocaria com a conseqüència un increment en la secreció de les formes no processades de proamilina, les quals s'hi uneix l'heparan sulfat proteoglicà, formant el nucli per a la formació de l'amiloid (53,120), i aquesta unió podria induir a canvis conformacionals de la proamilina, afavorint la formació de làmina β (90) (Figura 5).

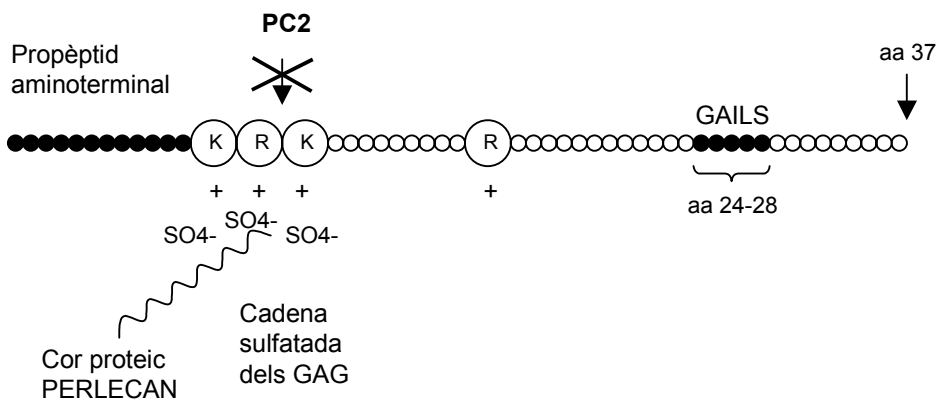


Figura 5.- Possible mecanisme per la formació dels dipòsits d'amiloid.

L'alteració del processament de la proamilina en la diabetis tipus 2, provocaria un augment de la secreció de la proamilina amb la regió N-terminal on s'hi unirien les cadenes dels glicosaminoglicans (GAG) del perlecan amb una alta afinitat. Aquesta unió a la membrana basal de la cèl·lula β de l'illot, podria ser el nucli per a la formació de l'amiloid.

2.5.- DIPÒSITS D'AMILOID I DIABÈTIS TIPUS 2

Prevalença de l'amiloid

Els dipòsits de substància amiloid apareixen als illots pancreàtics de la immensa majoria d'individus amb una diabetis tipus 2 clínicament establerta, constituint un fet característic de la malaltia (74). Així, s'ha demostrat la presència de dipòsits d'amiloid de substància amiloide a les autòpsies de més del 90% de pacients amb DM tipus 2 (128,129). En alguns individus, només es troba afectat un numero reduït d'illots, però en molts pacients els dipòsits són difusos afectant nombrosos illots. La degradació de l'illot, principalment de la massa β cel·lular, pot

ser determinant per a la severitat de la diabetis, així, pacients que requereixen tractament amb insulina presenten dipòsits d'amiloid més prominents i difusos, juntament amb una reducció més important de la massa cel·lular β , indicant que el grau d'amiloidosis als illots pancreàtics pot estar relacionada amb la severitat de la malaltia (130).

El fet que la presència d'amiloid hagi estat detectada en mostres d'autòpsies procedents de diferents poblacions, suggereix que es tracta d'un fenomen universal i comú a la malaltia, i no només característic d'un grup d'individus amb la síndrome (128,129). S'ha detectat també, encara que amb molta menys freqüència i severitat, la presència de dipòsits d'amiloid als pàncreas de persones d'edat avançada no diabètiques (131). La prevalença dels dipòsits d'amiloid augmenta amb l'edat, la qual cosa no és sorprenent donat que el procés d'envelliment s'associa a un deteriorament de la tolerància a la glucosa i a un increment de la prevalença de la diabetis tipus 2 (132).

Tot i que els dipòsits d'amiloid són característics de la diabetis tipus 2, també s'ha detectat la presència d'amiloid en pacients humans amb insulinomes, tumors de cèl·lules β caracteritzats per anomalies en el processament i la secreció de pèptids (107).

Dipòsits d'amiloid i diabetis tipus 2

La diabetis tipus 2 es desenvolupa principalment en individus majors de 40 anys (133). És una malaltia multifactorial, amb components genètics i ambientals, caracteritzada per un deteriorament progressiu en la regulació dels nivells de glucosa en sang, normalment associat amb obesitat i disminució de l'activitat física. Recentment, la incidència de la diabetis tipus 2 ha augmentat tant en individus joves (menors de 20 anys), com en individus d'edats més avançades (134).

La diabetis tipus 2 és caracteritzada per una alteració de la sensibilitat dels teixits perifèrics a l'acció de la insulina (resistència a la insulina) i per la secreció de la insulina (fracàs de la cèl·lula β). La contribució relativa de cada un d'aquests defectes és variable entre pacients, i també durant el curs evolutiu de la malaltia (135). Un augment de la concentració d'insulina circulant és un marcador de la disminució de la sensibilitat d'insulina, com succeeix en obesitat, en canvi, la disfunció de la cèl·lula β dona com a conseqüència una incorrecta secreció d'insulina en relació a la concentració de glucosa present.

Els pacients es tracten amb dieta, tot i que quan això és insuficient, la secreció d'insulina s'augmenta mitjançant l'administració de drogues com sulfonilureas, que estimulen la secreció de la cèl·lula β . La progressió de la malaltia duu a un reemplaçament de la insulina mitjançant injeccions.

Ha estat llargament qüestionat i de fet, encara ara no està clar, si els dipòsits d'amiloid estan involucrats amb la patogènia de la diabetis tipus 2 o bé, es desenvolupen com a conseqüència de la malaltia. No obstant, el fet que aquests dipòsits en pacients amb diabetis tipus 2 estiguin associats a una reducció de la població cel·lular β , suggereix que poden constituir un important factor etiopatògenic en el desenvolupament del fracàs de la cèl·lula β (136).

Citotoxicitat de l'amiloid a la cèl·lula β

S'ha demostrat en diversos estudis que les acumulacions d'amilina humana tant a nivell intracel·lular com extracel·lular, estan associades a la mort de la cèl·lula β , a través de diferents mecanismes. Estudis a cèl·lules COS-1, varen observar que la sobreexpressió d'amilina humana (però no la d'amilina de rata) induïa l'apoptosi d'aquestes cèl·lules (111). A més, l'exposició *in vitro* de fibretes d'amilina provoca la mort de cèl·lules β d'illots humans i de rata (137). S'ha observat que l'amilina

humana sintètica, que s'agrega espontàniament en forma de fibres, és tòxica per la cèl·lula β , en canvi, l'amilina de rosegadors sintètica o certs pèptids d'amilina humana que no formen agregats no produeixen citotoxicitat a les cèl·lules (111,137,138). Per tant, només la forma fibril·lar de l'amilina és la que provoca la mort de la cèl·lula β i la forma soluble de la proteïna no és tòxica.

El mecanisme pel qual les fibretes d'amilina indueixen apoptosi a les cèl·lules β , encara no està del tot establert. El fet que les fibretes d'amiloid es troben pròximes a la superfície cel·lular de les cèl·lules β *in vivo* (115) i que l'acumulació extracel·lular del pèptid està associada amb la mort de cèl·lula β , afavoreix la idea que el dipòsit d'amiloid podria induir apoptosi a les cèl·lules β degut la interacció de les protofibretes d'amiloid amb la membrana de la cèl·lula β i la subseqüent activació de caspases específiques intracel·lulars, que són els primers mediadors intracel·lulars de l'apoptosi. Existeixen estudis on s'ha observat que les fibres d'amilina humana (citotòxiques, i no les de rata), provoquen la formació de porus permeables al ions a la bicapa lipídica, que podrien afectar la homeostasi iònica de la membrana cel·lular i per tant induir a la mort programada de la cèl·lula (139,140).

3.- EL PROTEOGLICÀ HEPARAN SULFAT, PERLECAN

Els glicosaminoglicans (GAGs) són cadenes de polisacàrids no ramificats compostos per unitats repetides de disacàrids que inclouen un sucre amina (glucosamina o galactosamina) i un àcid urònic (àcids glucurònic o idurònic) (Taula 2). Els aminosucre es tan, generalment, acetilats, sulfatats o les dues coses alhora. Els àcids urònics també poden estar sulfatats. Les cadenes de GAG sulfatades, a excepció de l'àcid hialurònic, formen enllaços covalents amb un nucli proteic formant una macromolècula de proteoglicans.

Els GAGs ocupen un volum molt gran, són hidrofílics, de manera que formen gels amb facilitat. Poden actuar com a sedàs per regular el trànsit de molècules d'acord amb la seva grandària i/o càrrega.

Són importants constituents de la matriu extracel·lular, juntament amb els proteoglicans i les glucoproteïnes d'adhesió que componen la substància bàsica de la matriu extracel·lular. La resistència i elasticitat d'aquesta substància ve donada per les proteïnes fibroses com el colàgen i l'elastina.

En aquesta tesi ens centrarem amb el proteoglicà heparan sulfat de la membrana basal i la matriu extracel·lular, anomenat perlecan, degut a la seva forma rotatòria semblant a una perla, que s'observava per microscopia electrònica (141,142). És el major i el principal proteoglicà localitzat als illots de Langerhans.

3.1.- EL GEN I ESTRUCTURA MOLECULAR DEL PERLECAN

El gen humà del perlecan (HSPG2) és un gen de còpia única localitzat a la regió telomèrica del braç curt del cromosoma 1, en 1p36.1 (143). El gen perlecan de ratolí es troba al cromosoma 4 (144).

La seqüència sencera humana del DNA genòmic del perlecan ocupa 120 Kb i està format per 94 exons (145) i mostra un 85% d'homologia amb la seqüència de perlecan de ratolí.

GAG	Massa molecular (Da)	Disacàrids repetits	Aminosucre repetit	Enllaç covalent amb proteïna
Àcid hialurònic	10 ⁷ -10 ⁸	Glucuronat i N-acetil-glucosamina	Cap	No
Queratan sulfat	10000-30000	Galactosa i N-acetil-glucosamina	N-acetil-glucosamina	Sí
Heparan sulfat	15000-20000	Glucuronat (o iduronat) i N-acetil-galactosamina	N-acetil-galactosamina	Sí
Heparina	15000-20000	Glucuronat (o iduronat) i N-acetil-glucosamina	N-acetil-glucosamina	No
Condroitin-4-sulfat	10000-30000	Glucuronat i N-acetil-galactosamina	N-acetil-galactosamina	Sí
Condroitin-6-sulfat	10000-30000	Glucuronat i N-acetil-galactosamina	N-acetil-galactosamina	Sí
Dermatán sulfat	10000-30000	Glucuronat (o iduronat) i N-acetil-galactosamina	N-acetil-galactosamina	Sí

Taula 2.- Tipus de glucosaminoglicans.

El fet que dels cinc dominis del perlecan tant sols el primer sigui únic pel perlecan i la resta tingui una gran homologia amb altres gens, ha portat a la teoria que el gen del perlecan s'hagi format per duplicació gènica a partir d'un ancestro comú (146).

La regió promotora del gen humà del perlecan mostra una organització estructural característica de gens *housekeeping* i gens relacionats amb el control del creixement. Aquesta regió promotora es localitza en una illa de CpG, on s'ha perdut la caixa TATA o CAAT, i conté llocs d'unió per factors de transcripció com SP1 i ETF (145). També s'han detectat diferents llocs d'inici de la transcripció, mostrant un difícil control de l'expressió del gen.

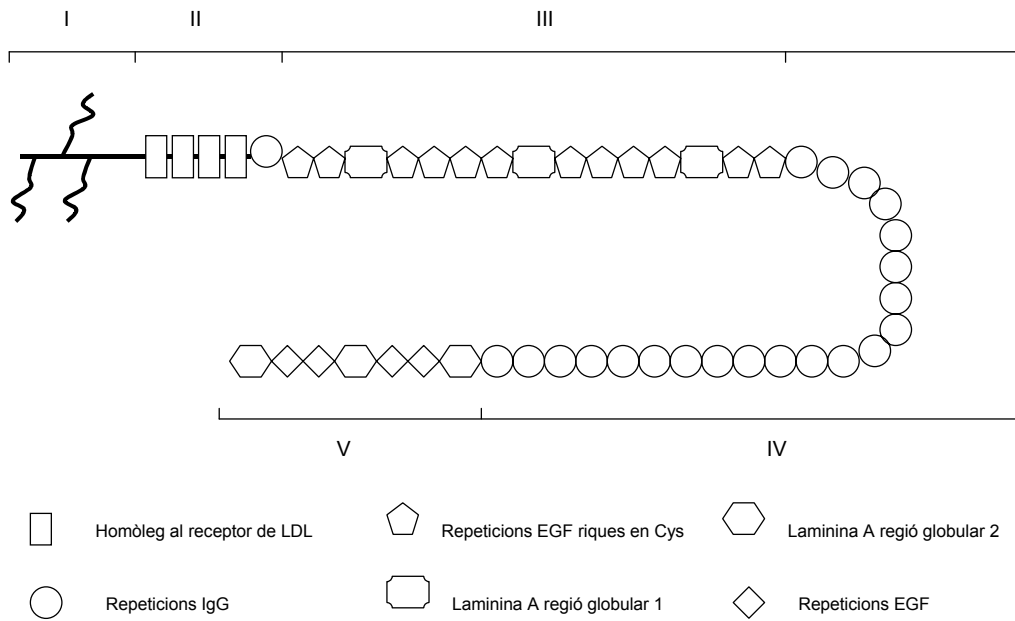


Figura 6.- Model estructural del perlecan

La proteïna madura, sense els 21 aminoàcids corresponents al pèptid senyal, està formada per 4370 residus que codifiquen una proteïna de massa de 467 KDa (147), un del polipèptids més llarg del cos humà. Aquesta gran proteïna es pot dividir en cinc dominis estructurals (145-148) (Figura 6).

El primer exó, que no s'inclou en el primer domini, codifica per la regió no traduïda de 5' i el pèptid senyal.

Domini I: Aquest és l'únic domini totalment específic del perlecan, té una alta homologia amb el domini I de ratolí (149), com succeeix en general per tota l'estructura molecular entre les dues espècies. Codifica pels exons del 2 al 6. Conté la regió d'unió amb les cadenes de GAGs. És altament ric en residus àcids i no conté repeticions internes.

Domini II: Homòleg al receptor de la lipoproteïna de baixa densitat (LDL) (150,151). Codifica per tres exons. És un domini ric en repeticions de cisteïna. Tant el perlecan com el receptor del LDL contenen el pentapèptid DGSDE, que media la unió del LDL amb el receptor. El domini IIa conté la primera part de repeticions de immunoglobulines (IgG). Codifica per l'exó 10 i 11.

Domini III: Homòleg al braç curt de la cadena de laminina A. Codifica per 27 exons. Es pot dividir en set subdominis: tres dominis globulars lliures de cisteïnes i quatre dominis rics de repeticions de cisteïnes.

Domini IV: Conté 21 repeticions consecutives homologues a les immunoglobulines (IgG) de N-CAM (152). Codifica per 40 exons. En ratolí només hi ha 14 repeticions de IgG, aquesta diferència és la que provoca que el perlecan a ratolí sigui 67 KDa menor.

Domini V: Homòleg amb el domini G carboxi-terminal de la cadena de laminina A. Codifica per 16 exons. Conté 7 subdominis: tres regions globulars i quatre repeticions similars al factor de creixement epidermal (EGF). Aquest domini

també conté dos pentapèptids SGXG, que són llocs d'unió de les cadenes de glicosaminoglicans diferents a l'heparan sulfat (153).

Una altra propietat del perlecan que comparteix amb d'altres proteoglicans, és la capacitat d'unió amb factors de creixement. Les cadenes d'heparan sulfat s'uneixen al FGF-2 (factor de creixement de fibroblast 2), aquesta unió els hi proporciona un paper important en la mitogènesi i angiogènesi (154). El nucli proteic del perlecan també té la capacitat d'unió amb diferents factors com PDGF-B i FGF-7.

3.2.- EXPRESSIÓ I REGULACIÓ DEL PERLECAN

Hassell i els seus col·laboradors varen ser els primers en purificar químicament la molècula del perlecan a partir de cèl·lules tumorals de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) provenint de sarcoma de rata, que produeix grans quantitats dels components de la membrana basal (155).

Estudis preliminars han identificat el perlecan a embrions preimplantats abans de la formació de la membrana basal (156). Durant la fase d'accessibilitat en la implantació del blastocit en l'úter, el perlecan es detecta en la superfície exterior del trofèctoderm, aquesta expressió va disminuint a mesura que l'embrió es va desenvolupant i queda definitivament implantat (157).

L'expressió del perlecan, en el desenvolupament embriogènic de ratolí, apareix en estats primerencs (E10.5) en teixits vasculogenitzats com cor pricardi i vasos sanguinis majors. Aquesta expressió coincideix amb el desenvolupament del sistema cardiovascular. En els següents estats (E11-13), l'expressió de perlecan s'acumula en varis teixits mesenquimals, especialment en cartílag, on persisteix durant el desenvolupament i fins a l'etapa adulta (158).

Estudis amb *Caenorhabditis elegans* amb la mutació en el gen *unc-52* (homòleg del gen perlecan a mamífers), produeix una alteració tant dels sarcomes com de la part muscular (159), indicant que el perlecan juga un paper important en la formació muscular.

Els ratolins que han perdut completament l'expressió del perlecan, o sigui, els embrions knockout homozigots no mostren anormalitats abans del dia 10 embrionari (E10), però entre els estats E10 i E12, la majoria d'embrions moren. Dels pocs que aconsegueixen sobreviure, moren al néixer amb greus problemes al cervell i a l'esquelet (160). Mitjançant aquests ratolins, es demostra que el perlecan és essencial pel desenvolupament embriogenec i té un paper important per mantenir la integritat de la membrana basal i la matriu extracel·lular al cartílag, però no té una funció crítica en la formació de la membrana basal, l'organogenesis i la migració cel·lular mesenquimal.

Estudis fets mitjançant hibridació in situ, detectaren la presència del transcrit de HSPG2 a totes les cèl·lules epitelials i endotelials de tots els teixits analitzats (147). L'expressió del perlecan és sempre present a la membrana basal de totes les cèl·lules endotelials d'òrgans vascularitzats, particularment a fetge, pulmó, melsa, pàncreas, tracte gastrointestinal i ronyó. Aquest fet suggereix que el perlecan a part de jugar un paper important durant les primeres etapes del desenvolupament, també sigui important per la maduració i el manteniment d'una varietat de teixits epitelials i mesenquimals diferenciats (161).

Centrant-nos amb l'expressió dels glicosaminoglicans als illots de Langerhans, es va estudiar la síntesi de GAG mitjançant el marcatge de ³⁵S (162). Els GAG sulfatats es sintetitzaven en un component de la fracció microsomal, es transferien als grànuls secretors, al mitocondri i a nucli. Es va detectar condroitin 4- i 6- sulfatat, dermatan sulfat i com a GAG predominant l'heparan sulfat.

El metabolisme dels proteoglicans en general pot estar regulat a diferents nivells: en la síntesi del nucli proteic, en l'addició de la cadena de glicosaminoglicans, en la sulfatació o elongació, o bé, en la degradació.

Existeixen diferents treballs on s'han analitzat els nivells d'expressió del perlecan a models animals diabètics. Un dels primers treballs, estudiaren l'efecte del heparan sulfat als ratolins diabètics (db/db) en els que se'ls havia fet créixer el tumor EHS, que produeix els components de la membrana basal. Observaren que el contingut d'heparan sulfat disminuïa en aquests ratolins, però aquest fet tant podia haver estat per una disminució en la síntesi com per un augment en la degradació del perlecan (163).

L'enzim glucosaminil N- desacetilasa catalitza un dels primers passos en la incorporació de grups sulfats de la cadena de glicosaminoglicans. En hepatocits de rates diabètiques, s'ha detectat una disminució de l'activitat d'aquest enzim (164). Una altre possibilitat de que podria estar afectada la síntesi de proteoglicans en la diabetis, és el fet que el nucli proteic de perlecan disminueix al fetge de ratolins diabètics (165).

Pacients amb nefrologia diabètica tenen disminuïda la biosíntesi de GAG als fibroblasts (166). Quan cèl·lules epitelials de glomèrul, tant de rata com de ratolí (167,168) eren cultivades a concentracions elevades de glucosa, mostraven una disminució dels nivells de mRNA de perlecan que es correlacionava amb una reducció de la síntesi de proteoglicans. El mateix efecte produït per la glucosa s'ha observat a cèl·lules messangials de rata (169) i a cèl·lules d'adiposit de ratolí (3T3-L1) (170), tot i que aquestes últimes, no es produeix variació en la biosíntesi de l'heparan sulfat.

També s'ha estudiat l'efecte dels àcids grassos en el metabolisme dels proteoglicans. Cèl·lules endotelials exposades a alta concentració d'àcid oleic o linoleic mostraven una disminució de la síntesi de HSPG (171). Resultats similars

s'han observat a cèl·lules endotelials tractades amb àcids grassos no esterificats units a albúmina (172). Aquest efecte dels àcids grassos no està del tot clar, ja que, cèl·lules musculars llises arterials humanes, al ser exposades a concentracions altes d'àcids grassos, els nivells d'mRNA de perlecan no es modificaven (173).

Per altra banda, s'ha observat que un augment de la producció de prostaglandines en rates diabètiques tractades amb estreptozotocina, pot ser responsable de la baixa concentració de proteoglicans (174). Estudis similars demostren que l'AMP cíclic provoca una disminució de l'expressió del perlecan a cèl·lules epitelials de glomèrul (175).

3.3.- PERLECAN I COMPLICACIONS A LA DIABETIS

Com s'ha comentat anteriorment, el perlecan és dels principals proteoglicans presents a la membrana basal. Els grups sulfat que conté, proporcionen a la membrana una càrrega negativa que li dona una permeabilitat selectiva especialment al glomèrul. A la diabetis, es produeixen canvis de composició i estructurals de la membrana basal, que provoquen una deficiència funcional de la mateixa. Un d'aquests canvis, és l'engruiximent de la membrana basal que implica una disminució de la càrrega negativa de la membrana i per tant, incrementa la porositat, hi ha un mal funcionament de la filtració i augmenta la concentració d'albúmina a orina, la proteinúria. El perlecan està implicat amb les principals complicacions que es donen a la diabetis, com la retinopatia, la nefropatia, problemes coronaris, arterosclerosi, dipòsits d'amiloid (176).

Nefropatia:

La nefropatia diabètica afecta a un de cada tres pacients amb diabetis tipus 1 (177). Es caracteritza per la presència de proteinúria, que és un marcador de complicacions coronaries (178). En les últimes fases de la malaltia, disminueix la filtració glomerular i augmenta la pressió sanguínia.

S'han fet molts estudis en models de nefropatia per estudiar l'efecte del perlecan (166-169). En general, en els models de diabetis tipus I, s'ha observat una disminució de la síntesi de HSPG. En canvi, en models de diabetis tipus 2, com els ratolins KKAY, tot i que es va detectar un engruiximent de la membrana basal al ronyó, els nivells de mRNA de HSPG no variaven (179).

Retinopatia:

La prevalença de la retinopatia diabètica augmenta en relació a la duració de la malaltia, el 15% dels pacients amb 15 anys d'evolució i el 50% dels pacients amb 20 anys d'evolució de la diabetis. Es caracteritza per un engruiximent de la membrana basal, una oclusió dels capil·lars, venes i artèries.

L'estudi de retines de rates diabètiques tractades amb estreptozotcina mostra una disminució tant de la síntesi com de l'expressió del perlecan (180). Aquesta disminució podria ser la responsable de l'augment de la permeabilitat dels capil·lars que presenten les retines de models diabètics.

Complicacions coronaries:

Tant el fetge com el cor són dos òrgans involucrats en les afectacions coronaries. En ambdós òrgans el perlecan és el principal component de la membrana basal.

Estudis en models de rates diabètiques han detectat una disminució de la sulfatació del heparan sulfat tant a cor com a fetge (181,182). Aquesta disminució podria ser deguda a l'exposició a alta concentració de glucosa (165) com s'ha detectat a cèl·lules HepG2. Tot i que cèl·lules endotelials de miocardi responen a la glucosa augmentant la síntesi de proteoglicans, inclòs el perlecan (183).

Lipoproteïnes i arteriosclerosi:

La hipertrigliceridemia és un problema força freqüent en pacients amb diabetis tipus 1, especialment aquells que no tenen un bon control de la glucosa (65). Es produeixen certes anormalitats lipoproteïques, com un augment del colesterol VLDL i de quilomicrons.

Les lipoproteïnes que contenen ApoB poden ser eliminades a través de diferents mecanismes (Figura 7). Lipoproteïnes B100 són eliminades principalment a través del receptor LDL. Les partícules B48 són eliminades pel receptor LDL a través d'ApoE o bé, via HSPG i el receptor de LDL relacionat amb proteïnes (LRP). Les lipoproteïnes B48 s'uneixen al HSPG i es comencen a enriquir d'apoE, un cop enriquides d'apoE es transfereixen al LRP per internalització. Una altra via, és la internalització directa de les lipoproteïnes a través del HSPG (184).

El paper del HSPG en el catabolisme de les lipoproteïnes no està tan clar, des de que un estudi recent apunta com a principal receptor el LRP i que el HSPG no és necessari (185). Tot i que altres estudis demostren que es requereix el HSPG pel processament cel·lular de les lipoproteïnes (186).

S'ha observat que canvis de la glicosilació d'apoE modifiquen la unió entre apoE i heparan sulfat, afectant així, aquells processos dependents d'aquesta interacció, com la internalització de l'apoB48 (187).

Considerant la teoria del reemplaçament de les lipoproteïnes, la disminució del perlecan detectada al fetge de models diabètics (165) podria afectar el catabolisme de les lipoproteïnes provocant l'acumulació d'aquestes partícules a plasma observada a la diabetis.

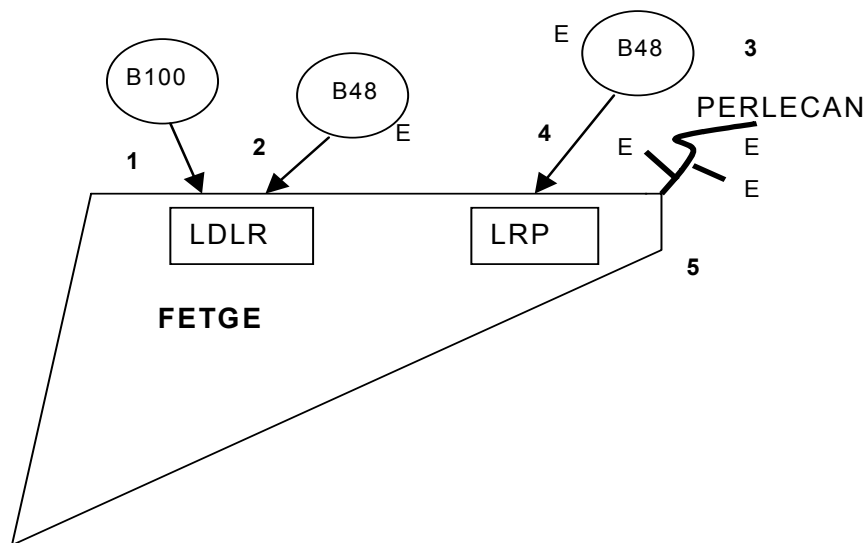


Figura 7.- Via de degradació de les lipoproteïnes apoB.

Les partícules Apo B100 són degradades principalment, via el receptor LDL (LDLR) (1). Les lipoproteïnes Apo B48 poden ser eliminades via LDLR a través de l'apolipoproteïna E (E) (2), o unint-se al heparan sulfat proteoglicà ric en apoE (3), que pot ser transferit per internalitzar-se al receptor LDL relacionat amb proteïna (LRP) (4) o bé, es pot degradar directament (5).

Una altra relació important entre diabetis i arteriosclerosi és la hipertrigliceridèmia associada especialment amb pacients amb diabetis tipus 2. Aquests pacients presenten elevats nivells de triglicèrids postprandial, que podria ser degut a un defecte de l'activitat de la lipoproteïna lipasa (LPL) que catalitza la lipòlisi de triglicèrids a partir de VLDL. Aquesta reacció té lloc al lumen de cèl·lules endotelials del capilar, és aquí on l'enzim s'uneix amb l'HSPG i pot actuar com a pont per la captació de lipoproteïnes. L'alliberació de LPL a partir de HSPG depèn en part de les interaccions electroestàtiques entre el HSPG i LPL (188). Canvis de la sulfatació del HSPG i per tant, de la densitat de càrrega, podria contribuir a la disminució de l'activitat de LPL observada en pacients diabètics.

Neuropatologia. Amiloidogènesi

En la neuropatologia també es produeix un engruïment de la membrana basal, on el perlecan hi està relacionat. En la polineuropatologia d'amiloid familiar es produeix una acumulació de fibres d'amiloid. La superfície d'aquestes fibres està formada per HSPG mentre que el nucli està format per amiloid P i condroitin sulfat proteoglican (189). Tot i que no es coneix la funció del HSPG en aquestes fibres.

El que és ben conegut, és la participació del perlecan en la majoria de formes amiloidogèniques (190). El perlecan ha estat colocalitzat amb la proteïna β -amiloid ($A\beta$) dels dipòsits d'amiloid de la malaltia d'Alzheimer (191,192,85) i en síndrome de Down (191), també s'ha detectat amb la proteïna prionica de les plaques d'amiloid de les malalties prioniques (ex, la malaltia de Creutzfeldt-Jakob, el síndrome de Gerstmann-Straussler i kuru) (193) i amb la proteïna amiloid AA de la inflamació associada amb l'amiloidosis (194).

Es produeix una alta afinitat d'unió del HSPG amb la proteïna precursora d'amiloid (APP) i la proteïna beta-amiloid (A β), fet que suggereix que el perlecan podria estar involucrat amb la inhibició de la degradació dels fragments beta amiloid que s'acumulen i formen plaques senils (195,196,197). Aquests estudis *in vivo* han trobat suport amb estudis *in vitro* on han demostrat que el perlecan protegeix la proteïna A β de ser degradada per proteases (87). Al mateix temps, aquesta interacció amb A β , protegeix l'heparan sulfat de ser degradat per heparitinases (198). Existeixen estudis on demostren que el perlecan a part d'unir-se a la proteïna A β , accelera la formació de les fibretes A β i estabilitza les fibretes d'amiloid un cop formades (199). S'han detectat quatre classes diferents de proteoglicans al cervell de pacients amb la malaltia d'Alzheimer, dels diferents proteoglicans, el perlecan és el que s'uneix amb una afinitat més alta al beta-amiloid (200). Aquests efectes produïts pel perlecan depenen dels grups sulfat que formen part de cadenes de carbohidrats que contenen els proteoglicans (201). La interacció entre heparan sulfat i A β també està en funció de l'estructura secundària i de l'estat d'agregació de A β (202). Cal considerar, però, que la sobreproducció del nucli proteic del perlecan és insuficient per produir amiloidosis (203).

Existeix una controvèrsia en la relació existent entre diabetis i la malaltia d'Alzheimer, mentre hi ha estudis on han observat que pacients amb diabetis tenen una alt risc de desenvolupar desordres neurològics (204), n'hi ha d'altres que no han trobat cap associació (205,206).

Dipòsit d'amiloid:

Com s'ha comentat a l'inici de la introducció, no estan definits els mecanismes responsables de la formació dels dipòsits d'amiloid, observats en pacients amb diabetis tipus 2. No obstant, és ben conegut l'acumul existent de

perlecan als dipòsits d'amiloid (84). S'ha demostrat que el perlecan interacciona amb l'amilina humana i actua afavorint la formació de les fibretes d'amilina (92).

El fet que recentment s'hagi identificat a la regió N-terminal de la pro-amilina un domini d'unió amb l'heparina (90), recolza la idea que el perlecan juga un paper important al procés d'amiloidogènesis de la diabetis tipus 2.

4.- IDURONAT-2-SULFATASA

L'iduronat-2-sulfatasa (IDS) (EC. 3.1.6.13) és un enzim lisosomal involucrat en el catabolisme de glicosaminoglicans. La seva activitat es basa en tallar el grup sulfat de la posició 2 de l'àcid idurònic del dermatan sulfat i de l'heparan sulfat (207) (Figura 8). La deficiència d'aquest enzim provoca la malaltia de Hunter.

4.1.- LES HIDROLASES LISOSÒMIQUES

Actualment, es coneixen uns seixanta enzims lisosòmics, la gran majoria dels quals són del tipus hidrolòtics (proteases, glucosidases, lipases, sulfatases, etc.), capaços de catalitzar la degradació seqüencial d'una gran diversitat de substrats macromoleculars incorporats per autofagia o endocitosi. Aquests substrats són reduïts a estructures monomèriques simples (aminoàcids, monosacàrids, àcids grassos, àcids nucleics, etc.) que seran reutilitzats per la cèl·lula.

La majoria d'aquestes hidrolases són glucoproteïnes que se sintetitzen en forma de precursors (proenzims) al reticle endoplasmàtic rugós; aquestes formes són glucosilades durant la seva translocació al lumen o immediatament després, amb una modificació posterior del seu contingut hidrocarbonat durant el seu transport pel reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi.

En determinats tipus cel·lulars, com ara als fibroblasts cultivats, els residus de manosa de les cadenes d'oligosacàrids de diverses glucoproteïnes (però no totes) són fosforilats al seu C-6 per mitjà de l'acció concertada de dos enzims. Aquest residu de manosa-6-fosfat es converteix en el marcador (o senyal) reconegut per receptors específics situats a les membranes cel·lulars, incloent-hi l'aparell de Golgi.

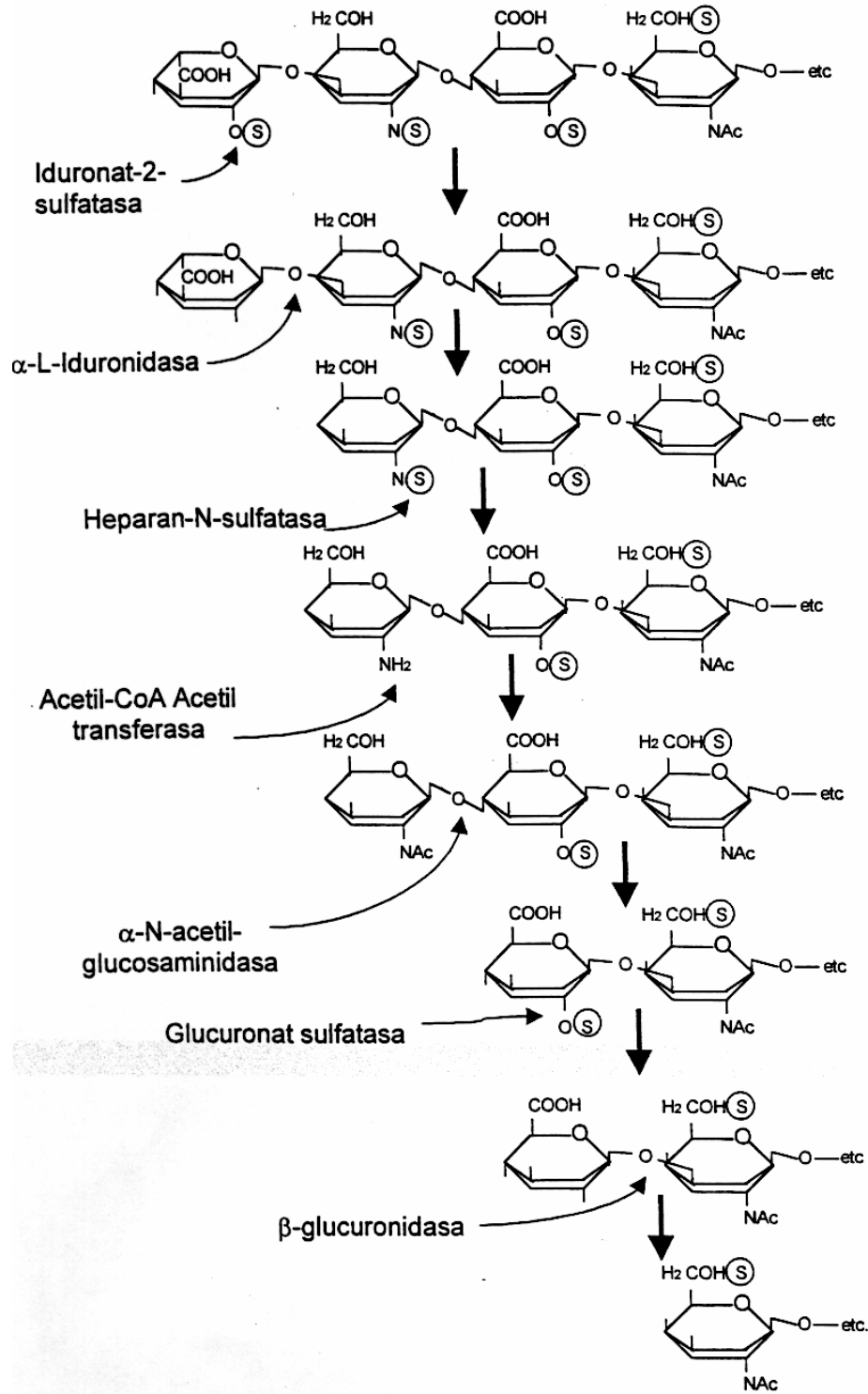


Figura 8.- Via de degradació de l'heparan sulfat

Aquests receptors específics són els responsables de l'empaquetament posterior de les diverses hidrolases àcides a les vesícules revestides, convertides així, en lisosomes primaris. El precursor de l'enzim lisosòmic segueix diferents rutes fins a la constitució de la forma madura en els lisosomes secundaris.

4.2.- EL GEN DE L'IDS

El gen humà del IDS està localitzat al braç llarg del cromosoma X, en concret a la regió Xq27.3-q28 (208-210). La seqüència sencera del gen ocupa unes 24 Kb, conté nou exons i vuit introns (209,211) (Figura 9).

El gen IDS està en direcció 5'-3' de telòmer a centròmer, o sigui, l'exó I està a l'extrem telomèric (212). El promotor potencial per l'IDS no presenta la caixa TATA però conté una seqüència consens de caixa GC, que recolza el seu paper com a gen de manteniment intern (208).

Comparant la seqüència del gen amb la d'altres sulfatases i tenint en compte la distribució de les mutacions que provoquen la malaltia, s'ha postulat que l'exó III del gen pot codificar per una zona important de la proteïna per l'hidròlisi dels ésters de l'iduronat-2-sulfat presents en el dermatan sulfat i l'heparan sulfat (211,213).

4.2.1.- EL PSEUDOGEN DEL IDS

El 1995 es varen trobar evidències de l'existència d'un pseudogen de l'IDS (213), al mateix any es va descriure el pseudogen i se'l anomenà IDS-2 (212). Està situat a 20 Kb telomèricament del gen IDS (215) i té homologia amb els exons II i III i els introns 2, 3 i 7 d'aquest gen. El pseudogèn té un 96% d'homologia amb les regions identificades, tot i que cal destacar que l'exó III del gen i el pseudogen són

exactament iguals. L'IDS-2 està situat 5'-3' de centròmer a telòmer, per tant, l'exó II del pseudogen està de costat amb l'exó I del gen (Figura 10).

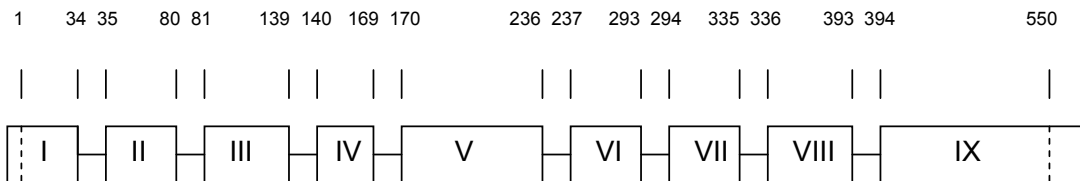


Figura 9.- Estructura del gen de l'IDS. Es mostren els nou exons del gen (I-IX) i s'han indicat els aminoàcids.

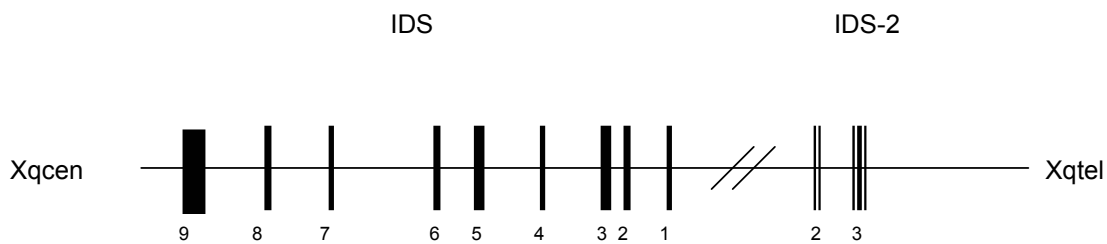


Figura 10.- Estructura del gen IDS i del pseudogen IDS-2.

4.2.2.- EL GEN DE RATOLI DE L'IDS

El gen de ratolí de l'IDS ha estat clonat i caracteritzat (216), es troba localitzat en el cromosoma X (217). La seqüència nucleotídica del cDNA clonat (MTA16) conté 1750 parells de bases (GenBank NM_010498), també s'ha descrit un altre transcrit de l'IDS (MTA13) en ratolí (217). La seqüència 3' no traduïda no conté la típica senyal de poliadenilació. Existeix un 85% d'homologia entre les seqüències codificants d'humà i de ratolí.

La seqüència completa de l'IDS de ratolí està formada per 564 aminoàcids i té una homologia del 89% amb la seqüència humana. El fet de que aquesta homologia comença a partir de l'aminoàcid 30, podria reflectir una diferència en el procés de maduració entre els enzims d'aquestes dues espècies.

4.3.- ESTRUCTURA MOLECULAR I BIOSÍNTESI DE L'IDS

S'ha aïllat i seqüenciat un clon de cDNA de 2.3Kb que conté tota la seqüència codificant del gen IDS humà (211). Al analitzar el precursor de 550 aminoàcids, s'ha vist que la proteïna té un pèptid senyal de 25 aminoàcids que és de reconeixement d'entrada al reticle endoplasmàtic, seguit de 8 aminoàcids més, que són escindits de la proproteïna, i vuit llocs potencials de glicosilació (Asn-X-Ser/Thr) (211). En aquest mateix treball, es va veure que l'IDS tenia una gran homologia amb les arilsulfatases A,B i C i la glucosamina-6-sulfatasa humana.

S'han identificat tres mRNAs de 5,7 5,4 i 2,1 Kb en placenta humana i un menor de 1,4 Kb, que es va identificar com a un transcrit alternatiu. Conté els primers set exons del gen i li manca els dos últims exons. No està clar la funcionalitat de la proteïna codificada per aquest transcrit (219). D'altra banda s'ha vist que els tres transcrits descrits del gen IDS, de 5,7 5,4 i 2,1 Kb, contenen el

mateix codi de lectura “open reading frame” i codifiquen per a la mateixa proteïna, són generats degut a la utilització de diferents senyals de poliadenilació (220).

La biosíntesi i el processament de l'IDS s'ha estudiat a fibroblasts d'humà transfectats amb el cDNA d'IDS (221). Només una petita part de la forma precursora de 73-78 KDa és processada, la majoria es degrada a nivell intracel·lular ó s'excreta al medi com a forma no fosforilada. La part que es processa es converteix en un precursor de 90 KDa en el que se li ha afegit la cadena d'oligosacàrids a l'aparell de Golgi que li permetrà ser reconegut pel receptor de la manosa 6-fosfat, i per tant, ser endocitat pels fibroblasts. La maduració de l'IDS té lloc després de la endocitosis, el precursor de 90 KDa és processat mitjançant talls proteolítics obtenint diferents intermediaris, el principal dels quals és de 55 KDa i es produeix l'alliberació d'un polipèptid de 18 KDa. Novament, un processament proteolític, per un tiol proteasa, dona com a forma madura un polipèptid de 45 KDa (Figura 11).

Aquest mateix processament es va comprovar a cèl·lules COS i a cèl·lules de limfoblastoid (L β) (222).

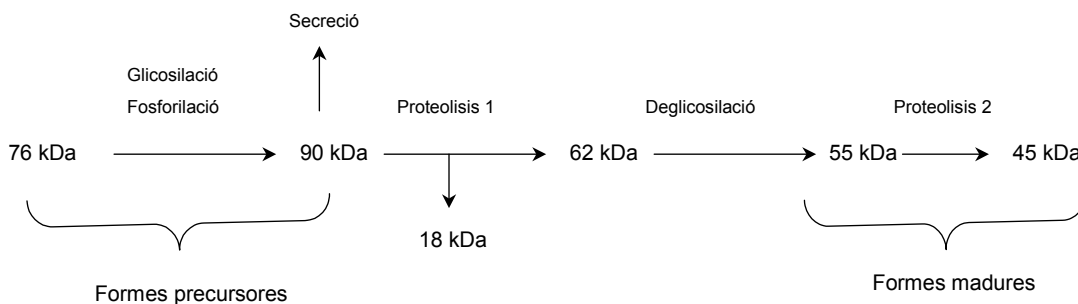


Figura 11.- Processament de l'IDS.

4.4.- EXPRESSIÓ DE L'IDS

L'iduronat-2-sulfatasa és un enzim lisosomal. Com s'ha comentat en l'apartat anterior, l'IDS és processat a nivell post-translacional, es fosforilen els residus de manosa-6-fosfat (M6P) i per tant queda marcat perquè es dirigeixi als lisosomes on s'uneix als receptors de M6P.

Aquests receptors a part d'estar als lisosomes, també estan a la membrana cel·lular i són capaços d'unir els enzims lisosomals que estan en circulació o a l'espai extracel·lular i conduir-los cap als lisosomes (223).

L'iduronat-2-sulfatasa ha estat purificat de plasma humà (224), placenta (225,226), orina (227), ronyó, pulmó i fetge (228). És a fetge on s'han identificat dues formes majoritàries, A i B, que es diferencien pel seu pI de 4,5 i <4,0 respectivament. Les dues formes contenen principalment els polipèptids de 42 KDa i 14 KDa, sorgits després del procés de maduració de la proteïna (228). Van comparar aquestes formes amb l'IDS purificat de ronyó, placenta i pulmó, i van veure que la forma A tenia el pes molecular nadiu i les subunitats en aquests teixits eren similars a les observades a l'enzim de fetge. Les dues formes A i B són actives davant una varietat de substrats derivats de l'heparan sulfat i el dermatan sulfat.

L'expressió dels quatre transcrits de l'IDS descrits anteriorment s'ha detectat a diferents teixits humans com: cor, cervell, placenta, pulmó, fetge, múscle esquelètic, ronyó i pàncreas (219,220). La màxima activitat enzimàtica s'obté a cervell (221).

4.5.- MALALTIA DE HUNTER. MUCOPOLISACARIDOSIS II

La malaltia de Hunter o mucopolisacaridosis de tipus II (MPS II) és una malaltia hereditària d'acumulació lisosòmica produïda per la deficiència de l'enzim iduronat-2-sulfatasa. Aquest enzim participa en la degradació dels glucosaminoglicans (GAGs) heparan sulfat i dermatan sulfat i, per tant, la seva deficiència provoca l'acumulació a les cèl·lules d'aquests metabòlits a mig degradar, causant el deteriorament i empitjorament clínic de forma progressiva. També, part d'aquests GAGs seran excretats per l'orina, fet que s'utilitza pel diagnòstic bioquímic.

És una malaltia hereditària recessiva lligada al cromosoma X i les dones portadores són totalment assintomàtiques.

La malaltia va ser descrita el 1917 per C. Hunter (229) que va observar una malaltia rara en dos germans que semblava lligada al cromosoma X, però van ser Bach i Sjöberg, per separat i al mateix temps, els que van descriure que la causant de la malaltia era la deficiència de l'enzim iduronat-2-sulfatasa (230,231).

Dins d'aquesta malaltia es poden distingir dues clíniques diferenciades, la forma severa i la forma lleu, que són els extrems d'un ampli espectre de severitat. La forma severa es caracteritza per trets facials toscos, poca talla, rigidesa articular, deformitats òssies i retard mental. A més, en molts casos també hi ha hepatomegàlia i sordesa. La malaltia sol manifestar-se entre els 2 i els 4 anys de vida amb un retard en els desenvolupament somàtic i neurològic progressiu (232), que porta a la mort entre els 10-15 anys de vida. Els pacients amb la forma més lleu de la malaltia tenen una esperança de vida més prolongada, una implicació mínima del sistema nerviós central i una lenta progressió del deteriorament somàtic. En general, la intel·ligència es troba preservada (233).

Les característiques fenotípiques semblen estar relacionades, almenys en part, amb diferents mutacions al·lèliques en el gen estructural de l'IDS. En general,

les mutacions sense sentit (nonsense) i els grans reordenaments estructurals (deleccions, insercions, inversions i duplicacions), solen estar associades amb un fenotip sever, ja que provoquen una manca (sovint completament) d'activitat enzimàtica (234). En el cas de les mutacions aïllades descrites, provoquen un gran ventall de clíniques, de manera que no es pot establir una correlació genotip - fenotip clara.

4.5.1.- TERÀPIA GÈNICA I MODELS ANIMALS

Com a teràpia per la malaltia de Hunter s'ha utilitzat la teràpia gènica per subministrar l'enzim IDS. En els primers estudis (235) es va utilitzar el vector retroviral L2SN per transduir el gen IDS a línies cel·lulars limfoblastoides de pacients amb la malaltia de Hunter. Les línies cel·lulars van expressar una alta activitat de l'enzim iduronat-2-sulfatasa (de 10 a 70 vegades superior que en leucocits de sang perifèria) i la manca d'acumulació de sulfat marcat radioactivament als GAGs va indicar que l'enzim IDS recombinant participava en el metabolisme dels glicosaminoglicans.

El 1995 es va aprovar el primer assaig clínic de teràpia gènica en limfocits per tractar la forma lleu de la malaltia (236,237). Després de l'estudi publicat per Di Francesco (238) es va aprovar el segon protocol de teràpia gènica per tractar els pacients amb la forma severa de la malaltia. En aquest estudi, utilitzaren els vectors adenovirus ja que aquests poden infectar cèl·lules del sistema nerviós central sense gaire (o gens) resposta immunològica i varen observar que eren capaços de produir una alta expressió de l'enzim IDS així com, normalitzar l'acumulació intraliosomal de GAG.

Els nous estudis però, apunten a la teràpia gènica utilitzant uns nous vectors retrovirals més segurs, amb una alta titulació vírica i que produeixen alts nivells d'expressió gènica (239,240).

Per la malaltia de Hunter, s'ha analitzat l'eficiència de transducció d'aquest vector retroviral (MT) contenint l'IDS (MT-IDS), a cèl·lules mare humanes CD34+ de medul·la òssia (241). Els resultats mostraren una alta expressió gènica i un 80% d'eficiència en les cèl·lules infectades, suggerint aquest sistema com a nova teràpia gènica per la malaltia de Hunter.

En la mucopolisacaridosis tipus I (MPSI), on es produeix un dèficit de l'enzim α -L-iduronidasa (IDUA), s'han realitzat estudis *in vitro* de teràpia gènica mitjançant vectors lentivirals, de manera que les cèl·lules transfectades mostraven alts nivells d'expressió de l'enzim i aquesta expressió persisteix com a mínim dos mesos (242). Aquest sistema seria totalment aplicable a la MPS II.

El gos, un Labrador Retriever, representa el primer model, i a més natural, de la MPS II (243). La malaltia va ser diagnosticada perquè el gos presentava descoordinació progressiva, intolerància a l'exercici i problemes visuals, també presentava trets facials toscos, macrodactília, distròfia corneal unilateral, osteopènia generalitzada i deteriorament neurològic progressiu. El curs clínic va anar empitjorant i finalment als 5 anys de vida es va haver de sacrificar el gos.

Estudis previs han descrit un model de ratolí "knockout" per a la malaltia de Hunter (244), el qual conté el gen de l'IDS truncat (l'exó 4 i part de l'exó 5), per tant hi ha una pèrdua de l'activitat enzimàtica de l'IDS i es produeix una acumulació de glicosaminoglicans (GAGs) en teixit. Aquest model proporciona una eina molt útil per a l'estudi de la teràpia basada en el reemplaçament de l'enzim, on s'han obtingut resultats positius.

HIPÒTESI I OBJECTIUS GENERALS

Hipòtesi

Els dipòsits d'amiloid apareixen als illots pancreàtics de la immensa majoria d'individus amb diabetis tipus 2 clínicament establerta, constituint un fet característic de la malaltia (74). Així, s'ha demostrat la presència d'aquests dipòsits en les autòpsies de més del 90% de pacients amb diabetis tipus 2 (128,129).

El principal component dels dipòsits d'amiloid és l'amilina, un pèptid de 37 aminoàcids sintetitzat per la cèl·lula β pancreàtica i secretat amb la insulina. En rosegadors a diferència de l'home, no s'han detectat dipòsits d'amiloid associats amb la diabetis. Aquest fet, s'atribueix a les diferències en l'estructura primària de la molècula d'amilina entre espècies. Aquestes variacions però, no són suficients per a la formació dels dipòsits d'amiloid, i altres factors hi estarien involucrats.

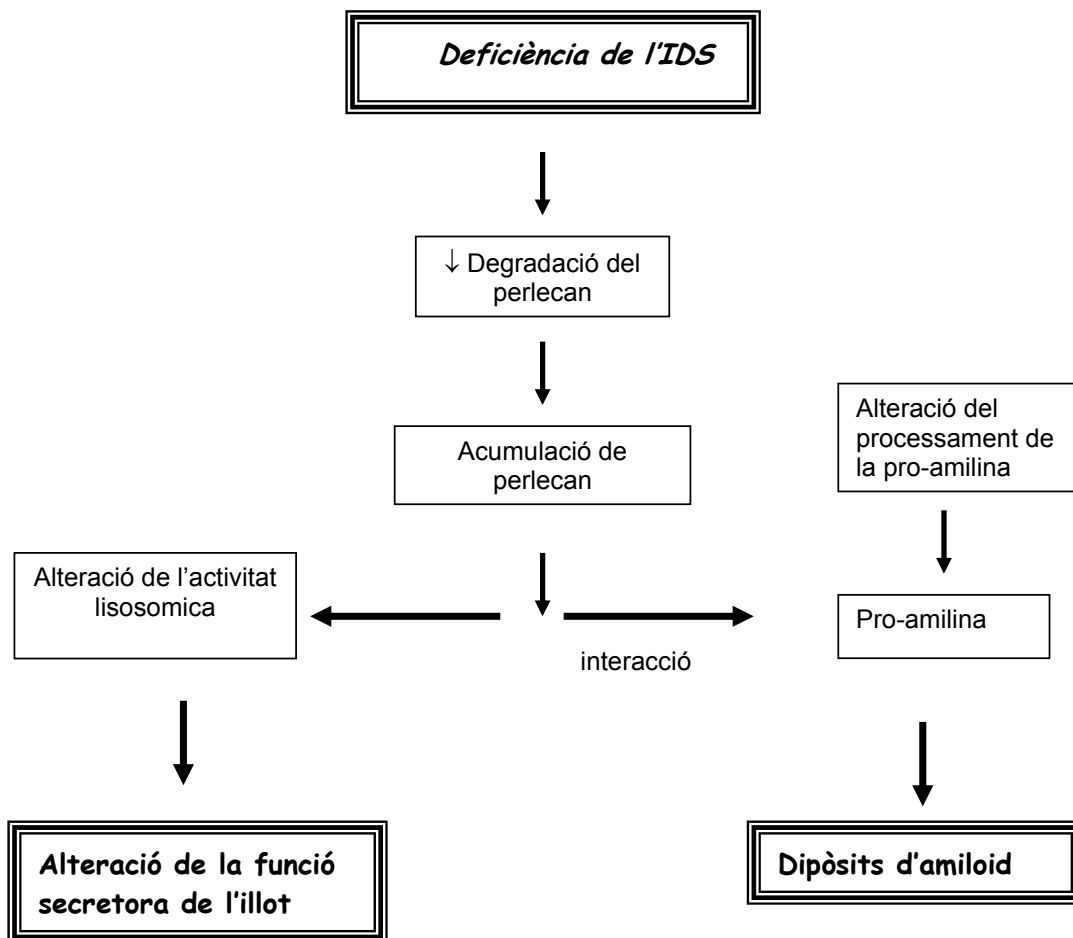
L'amilina no és l'únic component dels dipòsits d'amiloid, l'apolipoproteïna E (apoE) i l'heparan sulfat proteoglicà (perlecan), també en formen part. El perlecan ha estat identificat a la cèl·lula β pancreàtica (73), i tot i que actualment no està clar el seu paper en la formació dels dipòsits d'amiloid, evidències experimentals prèvies, han demostrat que existeix una interacció entre el perlecan i la pro-amilina humana que estabilitza i potencia la formació de fibretes (90,91).

D'altra banda, s'ha detectat l'expressió de l'enzim iduronat-2-sulfatasa (IDS), involucrat en la degradació del perlecan, als illots pancreàtics humans (245). Aquest fet, ens ha dut a hipotetitzar que l'IDS podria tenir un paper clau a l'illot pancreàtic.

En base a la relació existent entre l'IDS i el perlecan, s'ha elaborat la **hipòtesi de treball** del present projecte de tesi, que proposa que un dèficit en l'expressió de l'IDS podria donar com a conseqüència una alteració del metabolisme dels proteoglicans, en concret del perlecan als illots pancreàtics.

Aquest fenomen podria afectar a la funció secretora de la cèl·lula β pancreàtica, en base a l'acumulació de perlecan als lisosomes, i això provocaria una alteració de l'activitat lisosòmica, amb la qual cosa podria afectar el contingut d'insulina a la cèl·lula β .

Al mateix temps, aquesta acumulació de perlecan podria afavorir la interacció entre la pro-amilina i l'heparan sulfat, de manera que formarien el nucli del dipòsit d'amiloid.



Hipotètic model d'actuació de l'iduronat-2-sulfatasa a l'illot pancreàtic.

Objectius generals

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat estudiar l'enzim iduronat-2-sulfatasa als illots pancreàtics humans i de ratolí. Aquesta tesi ha estat dividida en tres objectius generals, els quals s'exposen a continuació:

Objectiu I:

Investigar la localització de l'IDS al teixit pancreàtic (teixit exocrí i illots pancreàtics) procedent d'humà i de ratolí, determinar en quin tipus cel·lular de l'illot s'expressa l'enzim i, investigar la localització subcel·lular de l'IDS a la cèl·lula β pancreàtica.

Objectiu II:

Investigar els senyals metabòlics que regulen l'expressió del mRNA de l'IDS als illots pancreàtics humans i de ratolí, i analitzar, als mateixos illots, l'expressió del perlecan i de l'amilina.

Objectiu III:

Analitzar l'efecte de l'IDS sobre la resposta secretora d'insulina a l'illot pancreàtic i a l'estructura morfològica de l'illot, així com, estudiar la possible relació entre un dèficit d'IDS i la formació de dipòsits d'amiloid.

OBJECTIU I:

**INVESTIGAR LA LOCALITZACIÓ DE
L'IDURONAT-2-SULFATASA A L'ILLOT
PANCREÀTIC.**

La malaltia de Hunter o mucopolisacàridosis tipus II (MPS II) és una malaltia hereditària d'acumulació lisosòmica, produïda per la deficiència de l'enzim iduronat-2-sulfatasa. Per la qual cosa, la majoria d'estudis relacionats amb l'IDS es basen amb l'anàlisi de les mutacions d'aquest gen, responsables de la malaltia de Hunter.

No es tenen evidències de quin paper té l'IDS a l'illot pancreàtic, tot i que estudis previs han demostrat l'expressió del mRNA de l'iduronat-2-sulfatasa a pàncreas humà (219,220) i als illots pancreàtics humans (245).

A fi d'assolir la nostra hipòtesi de treball, que proposa que l'IDS podria tenir un paper clau en la funció de l'illot pancreàtic, és necessari aprofundir en l'estudi d'aquest enzim a l'illot pancreàtic, tant en la seva localització com en la seva regulació i funció. Per aquest motiu, l'objectiu d'aquesta primera part del treball, ha estat el de localitzar l'IDS al teixit pancreàtic humà i de ratolí, així com, estudiar la localització subcel·lular de l'IDS a la cèl·lula β pancreàtica.

Objectius específics

- Analitzar l'expressió de l'IDS al teixit exocrí i als illots pancreàtics humans.
- Confirmar aquesta localització de l'IDS al teixit pancreàtic de ratolí.
- Determinar en quin o quins tipus cel·lulars de l'illot pancreàtic s'expressa l'IDS.
- Estudiar la localització subcel·lular de l'IDS a la cèl·lula β pancreàtica.

Disseny experimental

El disseny experimental que s'ha seguit a fi de determinar la localització de l'IDS al teixit pancreàtic, ha estat:

1. Isolament dels teixits i línies cel·lulars a estudiar.
2. Extracció del RNA i síntesi del cDNA.
3. Amplificació per PCR dels diferents gens.
4. Detecció per electroforesi en gels d'agarosa.

Els *primers* que s'han utilitzat per a la detecció dels diferents gens mitjançant la PCR, es descriuen a continuació a les següents taules:

HUMÀ	PRIMER 5' (5'-3')	PRIMER 3' (5'-3')	pb
IDS	CCCACAGCCTCCTCTTCCA	TGTCAGGTCTCCTGCCAGTG	90
IAPP	GGCATCCTGAAGCTGCAAGTA	CGTTGCACATGTGGCAGTGT	122
Insulina*	AGTTGCAGTAGTTCTCCAGCTGG	TGGCCCTGTGGATCCG	329
Amilasa	TGGAAACGATGTTAACGATTGG	CATGTTCCCTATTTGGCGCC	135
S9*	CAGAAGCTGGGTTTGTGCGAAAAC	TTGAGGACCCTGATGTGACGTTGG	404

Taula 1.1.- Taula dels *primers* dissenyats per l'amplificació dels diferents gens al teixit humà. (*) Es varen utilitzar per humà i per ratolí.

RATOLI	PRIMER 5' (5'-3')	PRIMER 3' (5'-3')	pb
IDS	GGCATCCCATAGCGTTCTCTT	CCAACCGACATGGTCACGTA	201
IAPP	CTCCAAACTGCCAGCTGTCC	TCCGTTTGTCCATCTGAGGG	101
Amilasa	TGGGGTTTGGTGCCTTCTGA	TGCAATTGCCATCGACCTTATCT	537
Glucagó	GCTCAGGCTCACAAGAAATACCA	CACCAGCCAAGCCAATGAAT	443

Taula 1.2.- Taula dels *primers* dissenyats per l'amplificació dels diferents gens al teixit i a les línies cel·lulars de ratolí.

Per tal d'estudiar la localització subcel·lular de l'IDS, el **disseny experimental** que s'ha seguit, ha estat el següent:

1. Construcció de la proteïna fusió IDS-EGFP-N1. La proteïna IDS està unida en la regió C-terminal amb la proteïna fluorescent verda.
2. Transfecció d'aquest constructe a cèl·lules β pancreàtiques.
3. Comprovació per *western blot* de l'expressió del constructe.
4. Colocalització per immunofluorescència amb un anticòs lisosomal.
5. Anàlisi del marcatge mitjançant microscopia confocal.

1. MATERIALS I MÈTODES I

1.1.- OBTENCIÓ D'ILLOTS PANCREÀTICS DE RATOLÍ

❖ Reactius

- Col·lagenasa
- Hank's (HBSS)
- Histopaque
- Albúmina sèrica bovina (BSA fraction V)

❖ Equipament i material

- Lupa binocular
- Material quirúrgic estèril (tissores, pinces, pinces hemostàtiques)
- Centrífuga refrigerada
- Campana d'esterilitat de flux laminar
- Agulla d'insulina de 2ml

❖ Procediment

Obtenció i digestió del teixit pancreàtic

Tots els ratolins que s'han utilitzat per l'extracció dels illots pancreàtics, han estat mascles de la soca CD-1 de dos mesos d'edat aproximadament. Els animals es sacrifiquen per dislocació cervical.

La manipulació de l'animal es fa sota la lupa binocular. S'obre la cavitat peritoneal i es pinça per tal d'obstruir la desembocadura duodenal del conducte pancreàtic o colèdoc. S'injecta en aquest 2 ml de solució col·lagenasa dissolta en Hank's (1.5 mg/ml) fins inflar completament el pàncreas. A continuació, l'òrgan es dissecciona i s'extreu de les estructures que l'envolten (estómac, melsa i intestí), cada pàncreas es diposita en tubs de centrífuga de 50 ml que contenen 1 ml de solució HBSS-col·lagenasa (3 mg/ml) i es manté en gel fins a la seva digestió.

S'incuben durant 6 minuts en un bany a 37°C en continua agitació. S'homogeneïtza el teixit digerit, resuspenent amb una pipeta Pasteur de plàstic i s'ajunten els pàncreas de dos en dos. Es renten dues vegades amb HBSS-BSA (1%) fred centrifugant a 100 g durant 5 minuts a 4°C.

Purificació dels illots

La separació dels illots de Langerhans de ratolí es realitza mitjançant gradients de densitat discontinua.

El gradient es realitza en els mateixos tubs de plàstic on s'ha realitzat la digestió. El teixit obtingut després dels rentats, corresponent a dos pàncreas, es resuspén amb 10 ml d'Hitopaque de densitat 1.119 g/l. La següent fase es forma afegint 10 ml de Histopaque de densitat 1.089 g/l. Aquesta densitat s'aconsegueix a partir de la mescla dels Histopaques de densitat 1.119 g/l i 1.077 g/l. Finalment, s'afegeixen 10 ml de HBSS-BSA (1%). Els tubs es centrifuguen durant 20 minuts a temperatura ambient a 829 g.

Els illots es recullen a la fase intermèdia i es renten dues vegades amb HBSS fred (4 minuts a 500 g a 4°C). Finalment els illots es resuspenen amb HBSS, es transfereixen en una placa de Petri i es fa una repesca manual sota la lupa binocular amb l'ajuda d'una pipeta.

Amb aquest procediment la puresa obtinguda és aproximadament del 100%. El rendiment oscil·la entre 100-200 illots / pàncreas processat.

1.2.- OBTENCIÓ D'ILLOTS PANCREÀTICS HUMANS

❖ Reactius

- Col·lagenasa
- Desoxirribonucleasa (DNasal)
- Sèrum fetal boví (FBS)
- Hanks (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS,)
- Difeniltiocarbazona o ditizona (DTZ, Sigma, StLouis, EUA)
- Bromur d'etidi/taronja d'acridina
- Solució de Ficoll
 - 300 g Ficoll
 - 500 ml Collins
 - 0,78 mg Benzamina
 - S'agita la solució tapada tota la nit.
 - S'afegeix solució Collins fins a 1 l i s'autoclava.
- Solució de digestió
 - 2 ml HBSS / g pàncreas processat
 - 3,5 mg col·lagenasa / ml HBSS
 - 0,4 mg DNasal / ml HBSS
- Solució de ditizona
 - 50 mg de ditizona en 2.5 ml de dimetilsulfòxid (DMSO). Es dilueix amb HBSS fins arribar a un volum de 50ml i es filtra a través de filtre Milipore 0,45µl.
- Solució de bromur d'etidi/taronja d'acridina
 - Solució estoc: 50 mg de bromur d'etidi i 15 mg de taronja d'acridina en 1 ml d'etanol 95%. Es dissol 1/50 en H₂O i es guarda alíquotat a -20°C.
 - Solució de treball: es dissol 1/100 la solució estoc en tampó PBS

❖ Equipament i material

- Lupa binocular
- Material quirúrgic estèril (tisoires, pinces, pinces hemostàtiques)
- Centrífuga refrigerada
- Campana d'esterilitat de flux laminar
- Agulla d'insulina de 2ml
- Catèter Venflon
- Material de laboratori en general

❖ Procediment

Obtenció i digestió del teixit pancreàtic

Els pàncreas humans es varen obtenir de donants cadàvers multiorgànics no diabètics, amb el consentiment previ de les seves famílies. Els procediments i protocols experimentals en els que s'utilitzen illots humans han estat aprovats pel Comitè Ètic de l'Hospital.

Abans d'extreure l'òrgan és perfora in situ amb solució freda de la Universitat de Wisconsin, prenent cura de deixar el drenatge venós del pàncreas obert i mantenint intacte el conducte de Wirsung. Un cop extret l'òrgan per l'equip de cirurgians, aquest s'immergeix en solució estèril de la Universitat de Wisconsin i es manté a 4°C fins el moment d'iniciar el seu processament. El temps d'isquèmia freda (des de que s'extreu fins que es processa el pàncreas) és sempre inferior a 12 hores. Només es processen aquells pàncreas que no presenten cap mena de traumatisme i que mantenen intacta la càpsula que envolta l'òrgan.

S'extreu de la glàndula (teixit pancreàtic total) el teixit adipós peripancreàtic, els ganglis limfàtics i els vasos sanguinis visibles macroscòpicament. Un cop net, es pesa la porció d'òrgan que es processarà, en funció d'aquest pes es comença a preparar la solució de digestió amb col-lagenasa i es precalenta a 37°C.

Es canula el conducte de Wirsung mitjançant un catèter Venflon (de 16-24G segons les dimensions del diàmetre intern del conducte) i s'injecta la solució de digestió prèviament preparada, que provoca l'inflament progressiu de la glàndula pancreàtica. Per accelerar el procés de digestió es divideix l'òrgan en tres parts: cap, cos i cua, es mantenen separades durant tot el procés, que té lloc en un bany a 37°C en agitació constant. La digestió del pàncreas s'aconsegueix a partir de l'esmicolament mecànic del teixit, que s'esdevé pel xoc entre els diferents fragments del pàncreas amb unes boles de vidre.

El procés de digestió es monitoritza mitjançant l'observació periòdica de mostres sota l'estereomicroscopi. Les mostres es tenyeixen amb la solució de ditizona. Aquest colorant s'uneix a unions bivalents, com el Zn^{+2} de l'interior dels grànuls d'insulina, donant una coloració vermellosa als illots que facilita la seva identificació.

Quan s'identifiquen illots separats del teixit exocrí, s'atura la digestió retirant els pots amb el teixit esmicolat del bany i ràpidament el material digerit es filtra i es recull en flascons Coning de 200 ml i es renta tres cops amb HBSS-FBS fred mitjançant centrifugacions a 500 g, durant 5 minuts a 4°C. A cada rentat es va ajuntant els diferent sediment fins obtenir-ne només un.

Purificació dels illots pancreàtics

La purificació dels illots pancreàtics humans de la resta de teixit exocrí es realitza mitjançant un gradient de densitat discontinu de Ficoll. Aquest gradient es basa en tres fases:

- a) El sediment obtingut després de la digestió en l'últim rentat es resuspén amb solució Ficoll de densitat 1.100 g/l. Es reparteix aquesta mescla en tubs de centrífuga de 50 ml, afegint 10 ml a cada tub.
- b) La segona fase de 10 ml es realitza barrejant la solució mare de Ficoll i HBSS-FBS, fins aconseguir una solució de densitat 1.058 g/l.
- c) En la part superior s'afegeixen 10 ml de HBSS-FBS.

Els tubs es centrifuguen a 829 g durant 20 minuts a 20°C.

Els illots purificats es recuperen de la interfase Ficoll-HBSS (1.058 g/l) i es renten 3 vegades amb solució HBSS freda.

Per tal d'aconseguir que els illots tinguin una puresa del 100% (com ha estat en el cas de tots els illots utilitzats en aquesta tesis), els illots es transfereixen a

plaques de Petri amb medi de cultiu i es fa una repesca manual sota la lupa binocular amb l'ajuda d'una pipeta.

Paràmetres del procés

1. Rendiment

Es fa un recompte del illots obtinguts tant després de la digestió com després de la purificació. S'agafen 2 alíquotes de 50 μ l i 100 μ l del material resuspès en un volum conegut i es tenyeixen amb ditizona. Es calcula el nombre d'equivalents d'illot obtinguts (illots amb un diàmetre estàndard de 150 μ m) per gram de pàncreas processat.

2. Puresa

S'utilitza la mateixa preparació d'illots que s'ha fet el contatge final. Es valora la relació existent entre illots de Langerhans i teixit pancreàtic exocrí.

3. Viabilitat tintorial

S'utilitza el mètode fluoromètric de tinció amb els colorants fluorescents taronja d'acridina i bromur d'etidi. El taronja d'acridina ens informa de la integritat de la membrana plasmàtica cel·lular, mentre el bromur d'etidi s'intercala entre les cadenes d'àcids nucleics. Sota el microscopi de fluorescència les cèl·lules viables apareixen de color verd i les no viables de color taronja. Sempre es treballa amb preparacions de viabilitat tintorial superior al 75%.

1.3.- EXTRACCIÓ D'RNA TOTAL

❖ Reactius

- QuickPrep™ Total RNA Extraction Kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK), conté:
 - Tampó d'extracció: Solució de tiocinat de guanidina (GTC) i N-lauroil sarcosina
 - Solució de clorur de liti en H₂O tractada amb DEPC
 - Solució de trifluoacetat de cesi (CsTFA)
- Etanol absolut
- Dietilpirocarbonat (DEPC, Sigma, St Louis, EUA)
- 2-Meracптоetanol
- Tampó TE: Tris-HCl 10 mM pH 7,5 i EDTA 1 mM pH 8
- H₂O tractada amb DEPC
 - En un litre d'aigua bidestil·lada, s'afegeix 1 ml de DEPC i es deixa agitant tota la nit (o un mínim de 12 hores) a temperatura ambient i s'autoclava.

❖ Equipament i material

- Microcentrifuga refrigerada
- Espectrofotòmetre (longituds d'ona 220-330nm)
- Vortex
- Material de laboratori autoclavat

Precaucions per a controlar l'activitat ribonucleàsica

El més important a considerar per a l'obtenció de RNA de bona qualitat és la possible contaminació de les ribonucleases (RNAses) alliberades durant el procés de lisi cel·lular (el teixit exocrí pancreàtic és especialment ric en aquests enzims) i de les provinents de fonts externes com l'epidermis de les mans i la pols. Per tant, cal que tot el material, tant de plàstic com de vidre, que estarà en contacte amb la mostra sigui estèril o bé autoclavat. La manipulació es fa sempre amb guants que es canvien varies vegades durant el procés.

Procediment

El protocol utilitzat per l'extracció de RNA es basa en la combinació de tres solucions: tiocinat de guanidina (GTC), clorur de liti i trifluoroacetat de cesi (246). Les avantatges principals d'aquest mètode respecte d'altres, és que no són necessaris solvents com fenol ni llargs temps d'ultra-centrifugacions.

La mostra, en aquest cas illots pancreàtics i cèl·lules, s'homogeneïtzen en una solució (tampó d'extracció) amb una alta concentració de GTC que provoca la inactivació de l'activitat de les ribonucleases endògenes, així com la completa dissociació dels components cel·lulars del RNA. Després d'una nova homogenització amb LiCl, l'extracte es centrifuga en presència de CsTFA. Un cop centrifugat, el RNA el podem detectar en forma de sediment a la part inferior del tub, mentre que les proteïnes formen una capa a la part superior del tub i el DNA queda en la fase líquida.

A continuació es descriu de forma detallada el procés:

- 1. Tractament de la mostra.** En el cas dels illots, tant els que han estat en cultiu com els frescos (s'han recollit just després de l'extracció) un cop pescats manualment es transfereixen en un tub eppendorf autoclavat i es centrifugen a 500 g durant 5 minuts. S'extreu el sobrenadant deixant els illots el més sec possible. Es congela ràpidament en neu carbònica i es guarden a -80°C fins el moment de l'extracció. De la mateixa manera es tracta el teixit exocrí, que es recull després de l'extracció del pàncreas. Les cèl·lules es tripsinitzen (veure cultiu cel·lular) dels flascons on es troben amb el seu medi de creixement. Es renten varies vegades centrifugant amb PBS. S'extreu el sobrenadant i es congelen seguint el mateix procediment que els illots.

- 2. Homogenització i extracció del RNA.** Durant tot el procés la mostra es manté en gel. El pellet es resuspen amb LiCl i es barreja vigorosament amb l'ajuda del vòrtex. S'afegeix β -mercaptoetanol i el tampó d'extracció, s'homogeneïtza passant el llisat 3 vegades per una agulla d'insulina. Finalment s'afegeix la solució de CsTFA, es mescla en el vòrtex i es deixa reposar la mostra 10 minuts en gel. Seguidament es centrifuga a 12.000 g durant 20 minuts a 4°C. En acabar, s'aspira el sobrenadant amb la bomba de buit vigilant amb el pellet format pel RNA.
- 3. Rentats del RNA.** El pellet obtingut es renta amb les tres solucions anteriors, per tal de treure l'excés de proteïna i DNA contaminant que resti en la mostra. S'agita en el vòrtex durant 5 polsos i es centrifuga a 12000 g durant 10 minuts a 4°C. Es descarta el sobrenadant. S'afegeix 1 ml d'etanol al 70% fred i altre cop s'agita i es centrifuga. S'aspira el sobrenadant i es deixa assecar el pellet de RNA amb el tub obert durant 10-15 minuts, per evitar l'entrada de pols es pot inclinar el tub cap avall. Un cop sec, el RNA es resuspen en 5-15 μ l d'H₂O-DEPC.
- 4. Quantificació del RNA.** Tant la concentració com la puresa del RNA es determina per espectrofotometria. Es dilueix una alíquota de la mostra amb tampó TE i es llegeix l'absorbància a les longituds d'ona de 260 nm ja que és on es detecta la presència dels àcids nucleics i a 280 nm on absorbeixen les proteïnes. Si la A_{260} està entre 0.05 i 2.0 reflexa una dilució de RNA acurada, si és superior a 2, cal tornar a diluir més el RNA.

La **quantitat** de RNA present en la mostra es calcula considerant que 1 A_{260} equival a 40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA de cadena senzilla. Per tant la formula a aplicar és la següent:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \mu\text{g/ml} \quad (\text{D} = \text{factor de dilució final})$$

La relació d'absorbàncies A_{260}/A_{280} ens informa de la **puresa** de la preparació del RNA. Quan es tracta d'una preparació homogènia d'àcid nucleic (no contaminada per la presència de cap altre cromòfor) aquesta relació està compresa entre 1,8 i 2.

1.4.- SÍNTESI DE cDNA.

En aquesta secció es descriu el mètode utilitzat per obtenir el cDNA a partir del RNA de diferents teixits. Aquest cDNA serà utilitzat per amplificar tot un seguit de gens mitjançant la tècnica de la RT-PCR.

1.4.1.- TRACTAMENT AMB DNasa

Per evitar qualsevol contaminació de DNA genòmic que resti a la preparació un cop realitzada l'extracció de RNA, tractem la mostra amb l'enzim desoxiribonuclease I (DNase I) que digereix tant la cadena simple com la doble del DNA a oligodeoxi-ribonucleotids que contenen el grup 5' fosfat.

Aquest procediment no és necessari quan els primers seleccionats per l'amplificació del gen estan localitzats entre dos exons (aquest és el cas de totes les amplificacions fetes per la tècnica de la PCR a temps real, Objectiu II).

❖ Reactius

- Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (DNase I, Amp Grade, Invitrogen)
- Tampó de reacció de DNase I 10x (subministrat amb l'enzim)

Tris-HCl (pH 8.4)	200 mM
MgCl ₂	20 mM
KCl	500 mM
- EDTA

❖ Equipament i material

- Microcentrífuga refrigerada
- Material de laboratori autoclavat

❖ Procediment

Per cada µg de RNA s'afegeix:

10x Tampó de reacció de DNase I	1 µl
DNase I, Amp Grade, 1 U/µl	1 µl
H ₂ O DEPC	X µl (volum final de 10 µl)

S'incuben els tubs 15 min a temperatura ambient.

La DNase I s'inactiva afegint 1 µl de EDTA 25 mM a la reacció i s'escalfa en un bloc tèrmic 10 minuts a 65°C.

1.4.2.- TRANSCRIPCIÓ REVERSA (RT)

Es sintetitza una cadena de DNA complementari (cDNA) a partir de RNA gràcies a l'acció de l'enzim transcriptasa reversa, una DNA polimerasa que pot utilitzar com a motlle tant DNA com RNA.

❖ Reactius

- Transcriptasa reversa M-MLV 200 U/µl (Gibco BRL)
- Tampó de reacció de transcriptasa reversa 5x (subministrat amb l'enzim)

Tris-HCl (pH 8)	250 mM
MgCl ₂	15 mM

KCl 375 mM

- Encebadors a l'atzar (random primers) 500 µg/ml (Promega,EUA)
- H₂O tractada amb DEPC
- dNTP: Mescla equimolar de 10mM de cada un dels quatre nucleòtids (dATP,dCTP,dGTP, dTTP) (Gibco BRL)
- Inhibidor de ribonucleases, RNAsin 40 U/µl (Promega)
- DTT (dithiothreitol) 100 mM

❖ Equipament i material

- Bloc tèrmic
- Material de laboratori autoclavat

❖ Procediment

1. Partim de la mostra de RNA ja tractada amb DNasa. La primera mescla a fer és:

RNA	1-2 µg
Random primers	1 µl
H ₂ O DEPC	X µl (fins a un volum de 5 µl)

2. S'incuba durant 5 minuts a 65°C i posteriorment es fa un pols centrifugant (30 segons 12.000g). Es manté en gel fins que no s'afegeixin els nous reactius.
3. Es fa una barreja, considerant que a cada tub s'hi ha d'afegir:

Tampó 5x	2 µl
dNTP	1 µl
DTT	0.5 µl
RNAsin	0.5 µl
M-MLV-RT	1 µl

El volum final de la reacció és de 10 µl

4. S'incuba 90 minuts a 37°C. Per inactivar els enzims s'escalfa 5 min a 97°C. Es congela a -20°C fins al moment de ser utilitzat.

1.5.- REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Consisteix en l'amplificació d'una seqüència específica del DNA catalitzada per l'enzim DNA polimerasa I que sintetitza la cadena en direcció 5' → 3' i conté activitat exonucleasa.

❖ Reactius

- Taq DNA polimerasa I 5 u/μl (Promega, Madison WI, USA)
- Tampó de reacció 10x
 - Tris-HCl (pH 7.2) 500 mM
 - MgSO₄ 100 mM
 - DTT 1 mM
- MgCl₂ 25 mM
- DNTP, mescla equimolar 10 mM de (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Gibco BRL)
- Oligonucleòtids encebadors (primers) a una concentració de 10 μM en H₂O
- DNA patró (cDNA provinent de RNA o plasmidi)

❖ Equipament i material

- Bloc tèrmic programable (Gene Amp PCR System 9700)
- Tubs eppendorf autoclavats de 0.5ml i 0.2ml
- Puntetes amb filtre
- Pipetes

❖ Procediment

1. Tot i que l'addició dels diferents reactius es pot fer a cada tub per separat, és aconsellable preparar una mescla que contingui tots els components de la reacció, excepte el DNA. Es reparteix després volums iguals d'aquesta mescla a cada tub de PCR i finalment s'afegeix a cada tub el DNA patró. En tota reacció de PCR cal preparar un tub control (blanc) que enlloc de DNA conté H₂O que ens serveix per controlar qualsevol contaminació.

2. L'ordre d'addició dels components de la reacció i les seves quantitats, són les següents:

	Concentració inicial	Concentració final	Volum inicial (µl)
H ₂ O			X ₁
Tampó de reacció	x10	x1	2,5
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2
dNTP	10 mM	0,4 mM	1
Primer 5'	10 µM	0,8 µM	2
Primer 3'	10 µM	0,8 µM	2
Taq DNA polimerasa	5 u/µl	0,05 u/µl	0,25
DNA patró		5-10 ng/µl	

1El volum final de la reacció és de 25 µl.

3. Els tubs ben tapats es col·loquen en el bloc tèrmic amb els cicles de temperatura i temps preprogramats. Encara que els cicles varien en funció dels primers seleccionats i del fragment de DNA a amplificar, un cicle estàndard podria ser el següent:

Desnaturalització inicial	95°C	5 min	} 30 cicles
Desnaturalització	95°C	1 min	
Hibridació	55°C	1 min	
Extensió	72°C	1 min	
Extensió final	72°C	5 min	
Mantenir	4°C		

1.6.- ELECTROFORESI D'ÀCIDS NUCLEICS EN GELS D'AGAROSA

A fi de poder separar, identificar i/o purificar molècules o fragments de RNA o DNA s'utilitza aquesta metodologia, que es basa en la separació dels fragments d'àcids nucleics en funció de la seva mida. Cada nucleotid aporta una carga negativa, procedent del grup fosfat, per tant, els fragments de DNA tenen pràcticament la mateixa relació carga/mida. Els gels d'agarosa tenen menor poder de resolució que altres gels (poliacrilamida), tot i així tenen un gran poder de separació (100-60000 pb) que està directament relacionat amb el percentatge d'agarosa.

❖ Reactius

- Agarosa (Gibco BRL ultrapura)
- Solució de bromur d'etidi a 0,5 µg/ml
- Solució TAE x50 (Tris-acetat/EDTA) a pH 8,5

Tris-HCl 2M	242 g
Àcid acètic glacial	57,1 ml
EDTA sòdic 100 mM	37,2 g
H ₂ O destil·lada	fins a un Volum de 1 l
- Marcador de DNA de pes molecular apropiat
- Tampó de càrrega x10 a pH 8

Ficoll 400	20%
EDTA sòdic	0,1M
Blau de bromofenol	0,25%
Xilècianol	0,25%

❖ Equipament i material

- Microones
- Aparell horitzontal d'electroforesi
- Font d'electricitat
- Transluminòmetre de llum ultraviolada

❖ Procediment

- 1. Preparació del gel :** Es barreja en un vas de precipitats X g d'agarosa, per aconseguir el % del gel necessari, amb un volum de 50 ml de TAE x1. S'escalfa al microones fins dissoldre l'agarosa, es deixa refredar la solució a temperatura ambient i s'afegeix el bromur d'etidi a una concentració final de 0,5 µl/ml. S'aboca la mescla al motlle pels gels i es deixa solidificar.
- 2. Preparació de les mostres :** S'afegeix a cada mostra la quantitat adient de tampó de càrrega. La finalitat del tampó de càrrega és la d'augmentar la densitat i proporcionar color a la mostra, facilitant així la seva càrrega en el gel i la visibilitat del seu front de migració a través del gel en direcció a l'ànode. Cal preparar també el marcador de pes molecular, que generalment es carrega en el primer pou, per controlar que el pes molecular de la mostra sigui l'adequat.
- 3. Condicions d'electroforesi :** Un cop s'han carregat les mostres, es connecta l'electroforesi a un voltatge entre 70-100 V, a temperatura ambient. Finalitzada l'electroforesi, el gel s'analitza en un transil·luminòmetre de llum ultraviolada.

1.7.- CONSTRUCCIONS PLASMÍDIQUES. SUBCLONATGE.

Es basa en inserir en un vector plasmídic un fragment concret de DNA. En aquest objectiu s'emprà aquesta tècnica per tal d'aconseguir la proteïna quimèrica: IDS - proteïna verda (EGFP, enhancer green fluorescent protein), a fi de poder localitzar l'enzim IDS a nivell subcel·lular. Per tant, s'explicarà aquesta metodologia agafant com exemple aquesta construcció en concret.

1.7.1.- CARACTERÍSTIQUES DEL VECTOR

El vector plasmídic utilitzat per aquesta clonació, com s'ha comentat anteriorment és el pEGFP-N1. És un vector d'expressió en cèl·lules eucariotes i es caracteritza per contenir el gen de la proteïna verda (EGFP) sota el promotor de Citomegalovirus (CMV), el principal ús d'aquest vector és el de generar proteïnes de fusió per estudis d'expressió i localització. El gen d'interès s'inserta en la regió N-terminal de la proteïna verda. El vector conté el gen de selecció kanamicina per a cèl·lules eucariotes.

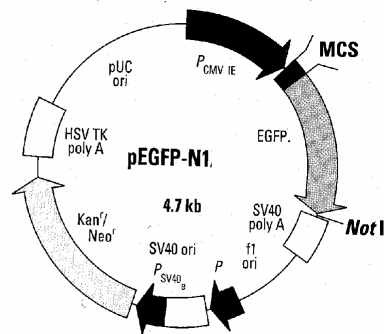


Figura 1.1.- Vector pEGFP-N1 (Clontech. Palo Alto, California, USA)

1.7.2.- OBTENCIÓ DEL cDNA D'INTERÉS

❖ Reactius

- DNA polimerasa Pfu (Stratagene)
- Oligonucleotids específics
- Reactius necessaris per la PCR

❖ Equipament i material

- Tubs eppendorf

❖ Procediment

En general el cDNA d'interès (també anomenat incert) que s'insereix en el vector es pot obtenir mitjançant la digestió amb endonucleases, si es troba en un vector plasmídic o bé, a partir de l'amplificació per PCR en un cDNA motlle que contingui la seqüència de l'incert (com ha estat en aquest cas). Les consideracions que es van tenir en compte per el disseny de la lligació de l'IDS en el vector d'expressió que conté la proteïna verda (pEGFP-N1), van ser les següents:

- a) En els primers dissenyats s'hi afegeix una seqüència determinada de nucleòtids corresponents al fragment que reconeix un enzim de restricció (endonucleasa) en concret. En aquest cas es va introduir el fragment de NheI i XhoI pels primers 5' i 3' respectivament.
- b) El fragment d'IDS amplificat conté el codó d'inici (ATG) i finalitza abans del codó STOP, ja que cal que just després de sintetitzar la proteïna IDS es sintetitzi la proteïna verda.
- c) Per l'amplificació s'utilitza l'enzim DNA polimerasa Pfu, ja que té activitat exonucleasa en direcció 3' a 5' que li permet corregir errors en l'incorporació dels nucleòtids.

Els primers dissenyats han estat:

NheI IDS 5': 5'- ATCTAGCTAGCGAA**ATG**CCGCCACC-3'
Nhe I

XhoI IDS 3' : 5'-ACCG**CTCGAG**ACAACCTGGAAAAGATCTCCAC-3'
Xho I

1.7.3.- PURIFICACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA DELS GELS D'AGAROSA

Per tal d'obtenir un determinat fragment de DNA des d'un gel d'agarosa, ja sigui per purificar un incert després d'una digestió amb endonucleases o bé per purificar el producte obtingut després d'una amplificació per PCR, s'utilitza el producte QIAEX (QIAGEN). La purificació es realitza per adsorció del DNA en partícules de silici en presència d'elevades concentracions de sals i, en canvi, l'elució es fa amb un tampó a baixes concentracions salines. D'aquesta manera s'obté l'àcid nucleic en tampó TE o H₂O pura, sense proteïnes, agarosa, sals, ni bromur d'etidi.

❖ Reactius

- QIAEX Gel Extracion Kits (QIAGEN)
- Tris-Cl 10 mM pH 8.5

❖ Equipament i material

- Bisturí
- Bany a 50°C
- Microfuga
- Transluminòmetre de llum ultraviolada

❖ Procediment

Aquest procés segueix les especificacions de la casa comercial que subministra els productes QIAEX.

1. El fragment de DNA a purificar s'escindeix amb un bisturí sota la llum UV d'ona llarga i es transfereix en un tub eppendorf.

2. S'afegeixen 3 volums del tampó de solubilització de l'agarosa (300 µl per 100 mg de gel). Aquest tampó conté una elevada concentració de perclorat de sodi que trenca els ponts d'hidrogen entre els sucres del polímer d'agarosa.
3. S'afegeix 10 µl de la suspensió de partícules de silici, les quals contenen una superfície activada on s'uneix el DNA. S'agita el conjunt i s'incuba 10 min a 50°C, agitant cada 2 min per tal de mantenir les partícules de silici en suspensió.
4. La matriu amb el DNA unit s'obté per centrifugació a 13.000 g durant 1 min.
5. Per extraure l'agarosa residual es fan dos rentats amb un tampó d'elevada concentració salina.
6. Les sals s'eliminen rentant dos cops amb un tampó amb etanol.
7. Després d'eliminar l'últim sobrenadant, es deixa assecat a temperatura ambient les esfera de silici amb el DNA adsorvit.
8. L'elució s'efectua per addició de 20 µl de Tris-Cl 10 mM pH 8.5. Es mescla i es deixa 5-10 min a temperatura ambient.
9. Finalment el DNA s'obté en el sobrenadant després de centrifugar la mescla 1 min a 13.000 g.

1.7.4.- QUANTIFICACIÓ

Després de purificar un fragment de DNA d'un gel d'agarosa o d'una precipitació amb etanol, es quantifica el material obtingut. Els fragments de DNA es poden quantificar:

- a) Mitjançant la lectura de la densitat òptica per absorbància en la longitud d'ona de 260 nm, tal i com s'ha comentat anteriorment per mesurar la concentració de RNA. En aquest cas cal considerar que 1 A_{260} d'una solució de doble cadena de DNA correspon a 50 µg/ml.

- b) Mitjançant la intensitat de fluorescència emesa pel bromur d'etidi intercalat en el DNA en un gel d'agarosa sota llum UV d'ona llarga. Donat que la quantitat de fluorescència és proporcional a la massa de DNA, es comparen les intensitats de la mostra problema amb les dels diferents fragments de DNA que constitueixen els marcadors de pes molecular.

1.7.5.-DIGESTIÓ DEL DNA PER ENDONUCLEASES DE RESTRICCIÓ

Per tal de poder inserir un fragment de DNA en un vector, cal que els extrems del DNA siguin *roms* o bé, cohesius. Això s'aconsegueix amb l'acció de les endonucleases, enzims de restricció. Les endonucleases reconeixen determinades seqüències nucleotídiques, entre 4-7 nucleòtids consecutius. D'altra banda els vectors de clonatge contenen una regió amb múltiples seqüències de reconeixement (MCS, multicloning site) per a diferents endonucleases, per tant, permet inserir en aquesta regió un fragment de DNA digerit prèviament amb les mateixes endonucleases que el vector.

❖ Reactius

- Endonucleases de restricció.
- Tampó de digestió (subministrat per la casa comercial) x10.
- BSA x100 10 mg/ml (en certs casos)

❖ Equipament i material

- Bany o bloc tèrmic a 37°C
- Tubs eppendorf

❖ Procediment

Un cop purificat el fragment de cDNA obtingut després de l'amplificació, es digereix tant el fragment com el vector pEGFP-N1 amb els enzims de restricció NheI i XhoI. Alhora de preparar una reacció de digestió, cal tenir en compte:

1. Són necessàries de 5-10 Unitats d'enzim per cada μg de DNA.
2. El volum d'enzim que s'afegeix a la reacció ha de ser inferior al 10% del volum final, per tal d'evitar que el glicerol (utilitzat com a crioprotector dels enzims) inhibeixi l'activitat enzimàtica.
3. S'utilitza el tampó de reacció subministrat per la casa comercial i en funció de l'enzim que es tracti cal afegir BSA.
4. Exemple de reacció de digestió:

DNA	5 μg
Tampó (amb BSA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	3 μl
XhoI	1,5 μl
NheI	1,5 μl
H ₂ O	X μl (fins a un volum final de 30 μl)

5. La digestió es deixa tota la nit a 37°C.
6. Per aturar la reacció, es procedeix a una extracció amb fenol, seguit de una precipitació amb etanol.

1.7.6.- EXTRACCIÓ FENOL/CLOROFORM I PRECIPITACIÓ AMB ETANOL

Una mescla a parts iguals de fenol i cloroform amb isoamilalcohol (24:1) s'utilitza per eliminar proteïnes de les preparacions d'àcids nucleics, en aquest cas seria per eliminar les endonucleases. El cloroform desnatura les proteïnes i facilita la separació de les fases aquosa i orgànica, i l'isoamilalcohol redueix la

pel·lícula d'impureses de la superfície del líquid. Finalment el DNA es precipita amb etanol pur a fi de millorar la seva puresa.

❖ **Reactius**

- Tampó TE: Tris-HCl 10 mM pH 7,5 i EDTA 1 mM pH 8
- Fenol / Cloroform / isoamilalcohol (24:24:1)
- Acetat de sodi 3 M pH 5,2
- Etanol 100% i 70%

❖ **Equipament i material**

- Vòrtex
- Microfuga

❖ **Procediment**

1. Extracció de DNA

- a) Es barreja en un agitador durant 10 segons una mescla de: Volum digestió + Volum TE + Volum fenol/cloroform/isoamilalcohol en proporcions 1:9:10.
- b) Es centrifuga a 13.000 g 2 min. S'extreu la fase superior i es traspasa en un tub nou.
- c) S'afegeix el mateix volum de cloroform:isoamilalcohol (24:1) i s'agita.
- d) Es torna a centrifugar i es recull la fase superior traspasant-la en un tub nou.

2. Precipitació de DNA

- a) S'afegeix 1/10 Volum d'acetat sòdic 3 M pH 5,2 i 2 Volum d'etanol 100% fred i es mescla.
- b) Es deixa a -70°C durant 15 min.
- c) Es centrifuga a 4°C, 15 min a 14.000 g.

- d) S'aspira el sobrenadant i es renta el DNA precipitat amb etanol 70% a temperatura ambient.
- e) Es mescla i es centrifuga durant 15 min a màxima velocitat.
- f) S'aspira el sobrenadant i es deixa assecar el DNA precipitat a temperatura ambient.
- g) Es resuspen el DNA obtingut amb Tris-HCl.

1.7.7.- FORMACIÓ DE RECOMBINANTS AMB L'ENZIM LLIGASA

La unió d'un segment de DNA al vector plasmídic linealitzat implica la formació de ponts fosfat entre els residus fosfatats localitzats a l'extrem 5' de la doble cadena de DNA amb els extrems hidroxilats 3' de l'altre doble cadena. Aquesta reacció la catalitza *in vitro* l'enzim d'un bacteriofag: T4 DNA lligasa. En molts casos es desfosforila el vector, a fi d'evitar que el vector es recircularitzi sense inserir el fragment de DNA.

❖ Reactius

- T4 DNA lligasa 10-20 U/ μ l
- Tampó de la lligasa x10 (subministrat amb l'enzim)

❖ Procediment

Després d'haver purificat i quantificat tant el fragment de DNA a inserir (IDS) com el vector (pEGFP-N1) digerits prèviament amb els mateixos enzims de restricció, té lloc la reacció de lligació. Normalment es proven diferents relacions molars entre vector i incert. La quantitat necessària de DNA incert a afegir depèn d'aquesta relació¹, del tamany tant de l'incert com del vector² i de la quantitat de vector que s'hi afegeix³ (entre 50-200 ng DNA). Es calcula amb la fórmula següent:

$$\frac{\text{ng vector}^3 \times \text{pb insert}^2}{\text{pb vector}^2} \times \frac{\text{insert}^1}{\text{vector}} = \text{ng insert}$$

1. Es prepara la reacció (mostrada com a exemple):

	BLANC	1:2	1:5
Vector (pEGFP-N1) 4700 pb	50 ng	50 ng	50 ng
insert (IDS) 1800 pb	-----	38 ng	95 ng
Tampó x5	2 µl	2 µl	2 µl
T4 DNA lligasa	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O	X ₁	X ₁	X ₁

X₁ Fins a un volum final de 10 µl

2. La incubació es realitza a temperatura ambient durant 3 h, ja que en aquest cas es tracta d'unir extrems cohesius. En el cas que es tracti d'extrems anivellats calen 16 h.

1.7.8.- TRANSFORMACIÓ BACTERIANA

Cal introduir el vector plasmídic que s'ha construït en bacteris, gràcies al seu procés de replicació permetrà obtenir una gran quantitat del DNA introduït.

❖ Reactius

- Solució CaCl₂
 - 60 mM CaCl₂
 - 15 % glicerol
 - 10 mM PIPES pH 7
- Medi LB
 - 10 g triptona
 - 5 g llevat
 - 5 g NaCl

H₂O fins a 1 litre

Ajustar el pH a 7,5 amb NaOH i autoclavar

- Paques LB: S'afegeix 15 g d'agar-agar en un litre de medi LB i s'autoclava.
- Antibiòtic (Ampicil·lina o Kanamicina)

❖ Equipament i material

- Tubs de creixament bacterià
- Tubs de 50 ml (falcons)
- Espectrofotòmetre
- Agitador de bacteries
- Estufa o incubador estàtic a 37°C
- Cremador de gas (Bunsen)
- Plaques de Petri de 90 mm diàmetre
- Bany d'aigua a 42°C
- Material de laboratori estèril o autoclavat (ependorf, falcons, puntes..)

❖ Procediment

1. Preparació de bacteris competents

Cal fer un tractament previ de les parets d'aquestes cèl·lules per a facilitar l'entrada del vector plasmídic, és a dir, per fer-les competents. El protocol utilitzat per a la soca bacteriana DH5 α ha estat el de clorur de calci, com es detalla a continuació:

- Inocular 200-400 ml de medi LB amb 5-10 ml d'un cultiu de 16h, prèviament inoculat amb una colònia bacteriana. Incubem a 37°C i amb una agitació constant de 300 cicles/min, fins que la densitat sigui equivalent a una lectura en l'espectrofotòmetre, a 590 nm, de 0,375.
- Es traspasa en falcons estèrils i prèviament refredats i es centrifuga a 1600 g durant 7 min a 4°C. A partir d'aquest punt es treballa en una càmera freda a 4°C.
- Els bacteris es tornen a la suspensió en volums de 10 ml amb la solució CaCl₂ a 4°C.

- d) Es recuperen les cèl·lules per centrifugació a 1100 g durant 5 min a 4°C.
- e) Es repeteixen els passos c) i d). Aquesta vegada es deixen els bacteris a 4°C durant 30 min.
- f) Es centrifuga de nou i les cèl·lules es resuspenen en un volum de 2 ml de solució CaCl₂.
- g) Es fan alíquotes de 100 i 200 µl que es congelen ràpidament amb neu carbònica i es guarden a -70°C fins al moment de ser utilitzades.

2. Transformació bacteriana

S'ha utilitzat el mètode de transformació bacteriana per xoc tèrmic, a fi que el DNA plasmídic entri eficientment en les cèl·lules.

- a) Es mescla en un tub eppendorf 100 µl de cèl·lules competents (descongelades i mantingudes en gel) i 2 µl de DNA que prové de la mescla de la reacció d'unió de recombinants amb la lligasa. Cal fer un control negatiu on no s'hi afegeix DNA.
- b) Es deixa a 4°C durant 30 min.
- c) Es provoca el xoc tèrmic, posant els tubs en un bany a 42°C durant 90 seg.
- d) Ràpidament es tornen a posar a 4°C durant 2-3 min.
- e) S'afegeix 900 µl de medi de cultiu bacterià LB i es deixa a l'incubador durant 1h a 37°C en moviment rotatori a 250 cicles/min.
- f) Es centrifuga a 1500 g durant 5 min.
- g) S'extreu 900 µl del sobrenadant i la resta es resuspén amb el pellet.
- h) S'inocula, sobre plaques agar-agar amb LB i antibiòtic del qual és resistent el vector plasmídic d'interès (en aquest cas kanamicina 30 µg/ml), els 100 µl dels cultiu bacterià en suspensió.
- i) Es deixen créixer les colònies a l'incubador estàtic a 37°C durant 16h.

1.7.9.- ANÀLISI DE RECOMBINANTS

Per avaluar quines són les colònies que contenen plàsmids recombinants d'aquelles que contenen el plàsmid sense l'incert, hi ha diversos sistemes. En primer lloc, però, caldrà extreure el DNA plasmídic de les cèl·lules, que s'ha realitzat mitjançant la lisi bacteriana alcalina.

❖ Reactius

- Solució I
 - Glucosa 50 mM
 - Tris-Cl pH 8 25 mM
 - EDTA pH 8 10 mM
- Solució II (preparar el mateix dia i a temperatura ambient)
 - NaOH 0.2N
 - SDS 1%
- Solució III
 - Acetat potàssic 5M 60 ml
 - Àcid acètic glacial 11,5 ml
 - H₂O 28,5 ml
- Tris-HCl pH 8
- Rnase

❖ Equipament i material

- Microfuga
- Incubador de bacteris

❖ Procediment

1. Extracció de DNA plasmídic mitjançant lisi de bacteriana

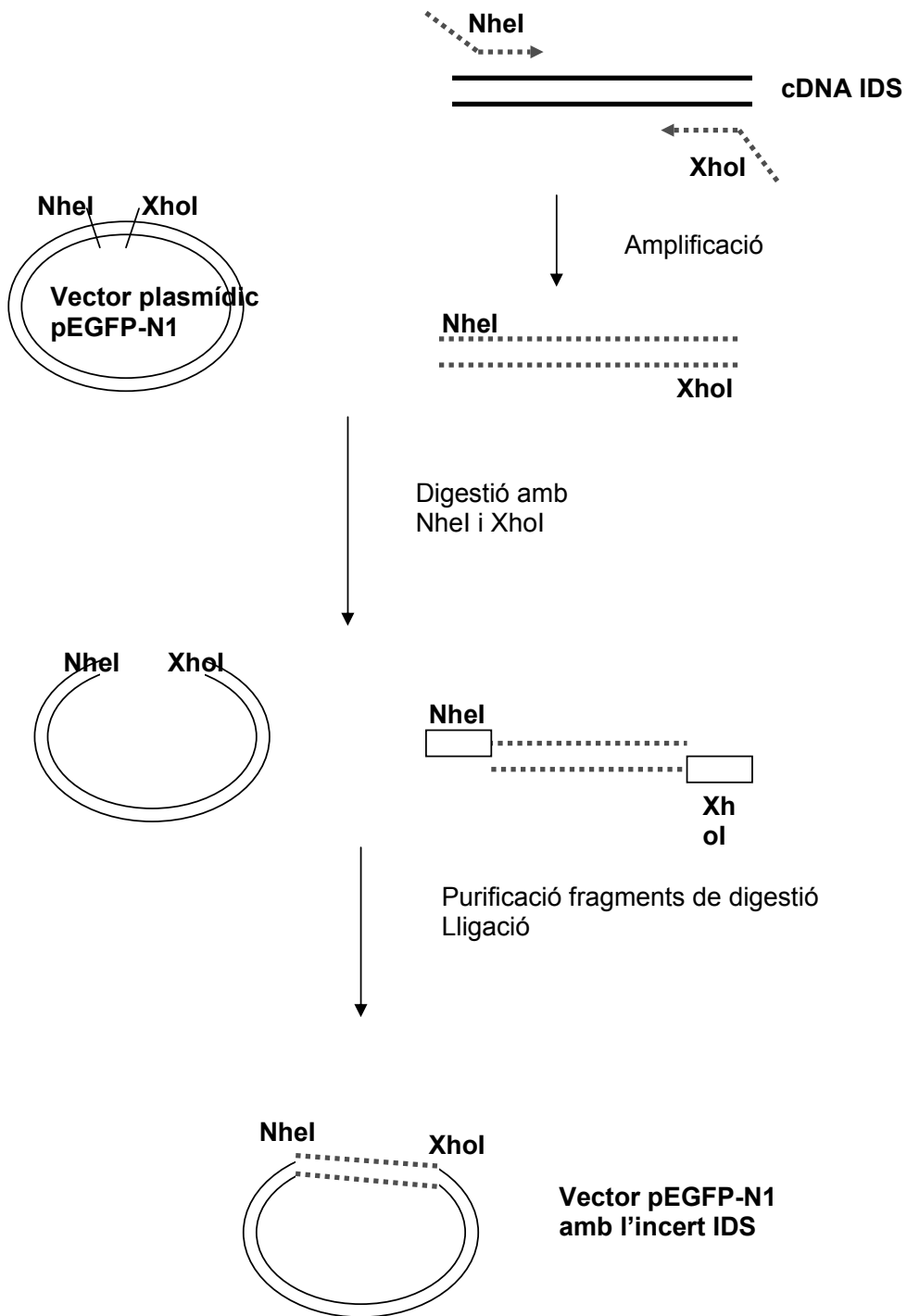
- a) Es transfereix una colònia aïllada de bacteris en 2 ml de medi LB que conté l'antibiotic seleccionador, per el qual el vector plasmídic conté el gen que li confereix resistència. S'incuba durant 6 h a 37°C en moviment rotacional.

- b) Es traspassa 1,5 ml del cultiu en tubs Eppendorf o similar i es centrifuga a 12000 g durant 30 seg en una microfuga a 4°C. La resta del cultiu (0,5 ml) es guarda a 4°C per al seu posterior ús, en el cas que sigui la colònia que presenta en plàsmid recombinant d'interès.
 - c) S'aspira el sobrenadant deixant tant sec com sigui possible el pellet bacterià.
 - d) Es resuspen el pellet amb 100 µl de Solució I (refredada en gel), per agitació vigorosa amb el vortex.
 - e) S'afegeix 200 µl de Solució II i es mescla invertint el tub ràpidament 5 vegades.
 - f) Finalment s'afegeix 150 µl de Solució III i es mescla per inversió. Deixar reposar durant 5 min els tubs en gel.
 - g) Es separa el DNA plasmídic en solució del precipitat format per centrifugació a 12000 g durant 10 min a 4°C. Es transfereix el sobrenadant en un tub nou.
 - h) La precipitació de proteïnes es realitza per extracció fenol/cloroform. El DNA plasmídic s'obté després de la precipitació amb etanol.
 - i) Es redissol el pellet de DNA amb Tris-HCl i RNase lliure de DNase a 20 µg/ml. Es guarda a -20°C, fins el moment de ser utilitzat.
- 2. Anàlisi de recombinants.** Els dos mètodes més utilitzats per discriminar la colònia que conté el DNA recombinant d'interès, són:
- a) **Anàlisi per digestió amb endonucleases.** Es tracta de digerir el DNA amb endonucleases de restricció de manera que, a partir del patró observat, després de la separació en un gel d'agarosa, podem discriminar entre el DNA plasmídic amb l'íncert i el DNA plasmídic sol. Al mateix temps ens dona la possibilitat de conèixer l'orientació de l'íncert. En aquest cas en concret es va utilitzar aquest mètode, de manera que digerint amb les endonucleases NheI

i XhoI s'aconseguia alliberar l'incert, només en el casos on aquest era present.

- b) **Anàlisi per PCR.** Consisteix en amplificar el DNA introduït en el vector plasmídic, mitjançant oligonucleòtids específics. Tot i ser un mètode més ràpid, té l'inconvenient que no discrimina l'orientació de l'incert.

1.7.10.- ESQUEMA DE CLONATGE



1.8.- CULTIU CÈL·LULAR

Les línies cel·lulars eucariotes utilitzades en aquesta tesi han estat:

COS-7 : Línies cel·lular de ronyó de mico. Prové d'una línia cel·lular de simi, ja establerta (CV-1), permissiva al creixement lític del virus de simi 40 (SV40). Aquesta línia va ser transformada per unes altres que presentaven un defecte en l'origen de SV40 el qual codifica un antigen tumoral (T) salvatge. Entre elles va sorgir la línia cel·lular COS-7 (247). Aquestes cèl·lules tenen la particularitat de tenir una elevada eficiència en la transfecció (80%).

MIN6 : Línia cel·lular endocrina. Prové de cultius primaris d'insulinomes desenvolupats en ratolins transgènics. Els transgènics duïen el promotor del gen de la insulina de rata unit a l'antigen tumoral del virus 40 de mico. Secreten insulina en resposta a diversos estímuls entre ells la glucosa, simulant les cèl·lules β normals (248).

α TC1 : Línia cel·lular alfa pancreàtica. Deriva de cèl·lules d'adenoma desenvolupats en ratolins transgènics, que expressen el gen llarg de l'antigen tumoral SV40 sota el control del promotor del gen preproglucagó de rata. Es caracteritzen per la producció i secreció de glucagó, sent ideals per l'estudi de cèl·lules α (249).

293T : Línia cel·lular humana de ronyó. Expressa constitutivament l'antigen T del virus 40 de mico (SV40). Aquestes cèl·lules es caracteritzen per ser altament transfectables (250)

Comentario:

❖ Reactius

- Medi de cultiu per cèl·lules MIN6

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	500 ml
Glucosa	4,5 g/l
FCS (Sèrum fetal boví, inactivat)	15% (v/v)
β -mercaptoetanol	5 μ M
penicil·lina	100 U/ml
estreptomicina	100 μ g/ml

- Medi de cultiu per cèl·lules COS-7, α TC1 i 293T

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	500 ml
Glucosa	4,5 g/l
FCS (Sèrum fetal boví, inactivat)	10% (v/v)
L-Glutamina	4 mM
penicil·lina	100 U/ml
estreptomicina	100 μ g/ml

- Tripsina 0,5 g/l
- EDTA 0,2 g/l
- Tampó fosfat salí (PBS estèril)
- Dimetil sulfòxid (DMSO)

❖ Equipament i material

- Campana de flux laminar
- Material estèril
- Criotubs
- Flascons

❖ Procediment

Les tècniques més utilitzades alhora de treballar amb cultius cèl·lulars, són les descrites a continuació:

1. Manteniment i tripsinització cel·lular

Les cèl·lules es mantenen a 37°C en una atmosfera humida contenint 5% de diòxid de carboni. El medi de cultiu es renova regularment cada 48 h aproximadament.

Quan les cèl·lules es troben en un 80% de confluència es tripsinitzen, ja que són cèl·lules que creixen adherides en monocapa. El procediment que es segueix és el següent:

- a) Es treu el medi de cultiu i es renten les cèl·lules amb PBS estèril .
- b) S'afegeix la tripsina/EDTA de manera que quedi en contacte amb totes les cèl·lules i seguidament es retira. Es deixa el flascó en l'incubador controlant fins que les cèl·lules s'han desenganxat.
- c) S'afegeix el medi de cultiu necessari per repartir les cèl·lules en diferents flascons.

2. Congelació de línies cel·lulars

Després de tripsinitzar les cèl·lules es resuspenen amb medi de cultiu amb un volum de 3 ml per flascons de 75 cm² i 1 ml per flascons de 25 cm². S'afegeix 0,5 ml d'aquesta suspensió en criotubs que contenen 0,5 ml de DMSO 20%, de manera que la concentració final de DMSO és del 10%. Els criotubs s'envolten amb cotó i es congelen a -80°C.

1.9.- TRANSFECCIÓ CEL·LULAR

Per tal que la proteïna recombinant, en aquest cas IDS-EGFP, s'expressi en un cultiu cel·lular, després de subclonar-la en un vector d'expressió per cèl·lules eucariotes, cal transfectar la construcció plasmídica en una línia cel·lular. Existeixen diferents mètodes de transfecció, en aquest cas s'ha utilitzat la transfecció mitjançant lípids. Es basa en l'ús d'una composició de lípids catiónics que s'associen a les càrregues negatives dels grups fosfats del DNA formant semiliposomes amb capacitat d'internalitzar-se en les cèl·lules.

❖ Reactius

- LipofectAMINE Reagent
- Plus™ Reagent
- DMEM
- Medi de cultiu suplementat x2

❖ Procediment

1. El dia anterior a la transfecció es tripsinitzen les cèl·lules en pous de 10 cm², deixant 2·10⁵ cel/pou.
2. Es forma el pre-complexe de DNA amb Plus Reagent: Es dilueix en vials de poliestiré 2 µg de DNA en medi de cultiu sense sèrum (DMEM) (amb un volum final de 100 µl) i s'afegeix 6 µl Plus Reagent, es deixa incubar durant 15 min a temperatura ambient.
3. En un altre tub es dilueix 4 µl de LipofectAMINE amb DMEM fins a un volum final de 100 µl.
4. Es combinen els pre-complexes de DNA (pas 2) amb la lipofectAMINE diluïda (pas 3), es mescla i es deixa a temperatura ambient durant 15 min.

Paral·lelament a la formació de complexos, es bescanvia el medi de cèl·lules per 800 µl de medi en absència de sèrum (DEMEM).

5. S'afegeix els complexos DNA-PLUS-LipofectAMINE en cada pou i s'incuba a 37°C amb 5% de CO₂ durant 3 h.
6. Després de la incubació, sense retirar el volum de l'incubació anterior, s'afegeix 1 ml de medi de cultiu contenint el doble de sèrum fetal boví i antibiòtics (medi suplementat x2) de forma que la concentració final sigui igual a l'habitual.
7. Després de 24 h d'incubació es canvia el medi i a les 48 h ja es poden recollir les cèl·lules per ser analitzades.

1.10.- IMMUNOFLUORESCÈNCIA INDIRECTA

Per detectar tant la presència com la localització a nivell cel·lular d'una proteïna en concret, es fa servir un anticòs primari en contra de la proteïna d'interès i un anticòs secundari conjugat amb el fluorocrom per tal de ser detectat. En aquest treball, es realitzaren varies immunodeteccions utilitzant com anticòs primaris diferents marcadors subcel·lulars per detectar la localització subcel·lular de la proteïna d'interès, iduronat-2-sulfatasa, detectada a partir de la fluorescència emesa per la proteïna verda a la que estava unida.

❖ Reactius

- Tampó fosfat salí (PBS)
- Paraformaldèid
- Saponina
- Albúmina sèrica bovina (BSA)
- Anticòs primari
- Anticòs secundari conjugat amb un component fluorogènic
- Medi de montatge: Tris-HCl 120 mM pH 8,5; 12 % Moviol i 30 % glicerol

❖ Equipament i material

- Cambres-porta objectes
- Microscopi de fluorescència
- Microscopi confocal
- Camera humida

❖ Procediment

1. Al cap de 24 h d'haver fet la transfecció, abans de fer el canvi de medi, es tripsinitzen les cèl·lules passant-les dels pous de 10 cm² a cambres-porta objectes.
2. A l'endemà té lloc el procés d'immunocitquímica en si. Es retira el medi de cultiu i es renten les cèl·lules dos cops amb tampó fosfat salí fred (PBS) amb agitació suau.
3. Es fixen amb paraformaldheid al 4% durant 10 min a temperatura ambient.
4. Es renten dues vegades amb PBS i es realitza el bloqueig i la permeabilització amb una solució que conté saponina 0,1 % i BSA 1 % en PBS durant 15 min a temperatura ambient.
5. Seguidament, sense rentar les cèl·lules, s'incuben amb l'anticòs primari diluït amb el tampó de bloqueig en una camera humida. El temps d'incubació està en funció de l'anticòs primari usat, pot variar entre 3 h i 16 h.
6. Després de successius rentats amb PBS, s'incuben les cèl·lules durant 1 h amb l'anticòs secundari conjugat (en aquest treball s'ha utilitzat fluoresceïna rodamina) diluït amb tampó de bloqueig. A partir d'aquest punt cal evitar l'incidència de llum en les cèl·lules.
7. Finalment es tornen a rentar amb PBS i s'afegeix el medi de monatatge Moviol. Les preparacions es cobreixen amb un cobreobjectes i s'examinen al microscopi de fluorescència o al confocal en el cas d'haver fet doble tinció.

1.11.- PRODUCCIÓ DE L'ANTICÒS CONTRA L'IDS

La producció de l'anticòs policlonal que reconeix l'IDS humà i de ratolí, es va encarregar a la casa comercial *Genosys*, i fou produït en conills. El pèptid sintètic que es va dissenyar, va ser el següent: DIHAGELYFVDSPLQDHNMYNDSQGGD.

La detecció de l'IDS mitjançant aquest anticòs només es va aconseguir en cèl·lules on s'havia transfectat un constructe que expressava la proteïna IDS, per tant quan l'expressió de la proteïna era molt elevada.

2.- RESULTATS DE L'OBJECTIU I

2.1.- EXPRESSIÓ DE L'IDS AL TEIXIT PANCREÀTIC HUMÀ

Totes les mostres utilitzades en aquest objectiu, després de l'extracció del RNA, s'han tractat amb l'enzim DNasa, per evitar qualsevol contaminació procedent del DNA genòmic. Com a control d'aquesta possible contaminació, s'ha amplificat una part de la mostra on no s'hi havia afegit l'enzim transcriptasa reversa. També s'ha utilitzat un control de l'amplificació, anomenat blanc, el qual enlloc de cDNA mostra conté H₂O.

Com s'observa a la Figura 1.2, l'expressió de l'IDS es detecta als illots pancreàtics, mentre que al teixit exocrí no es detecta cap senyal.

S'han amplificat diferents gens específics dels illots pancreàtics i del teixit exocrí, per tal de comprovar la puresa de les mostres. Així, l'amilina i la insulina s'han amplificat com a controls positius dels illots pancreàtics, ja que l'expressió d'aquests dos gens és específica a cèl·lula β pancreàtica (44), de la mateixa manera, el gen de l'amilasa s'ha amplificat com a control del teixit exocrí (251,252). El gen, que codifica la proteïna ribosomal S9 s'ha amplificat com a control de la integritat del mRNA de les diferents mostres, ja que aquesta proteïna s'expressa constitutivament a tots els teixits (253).

El fet de detectar l'amilina i la insulina específicament als illots i l'amilasa al teixit exocrí, demostra que les dues mostres són pures i no existeix contaminació entre elles (Figura 1.2).

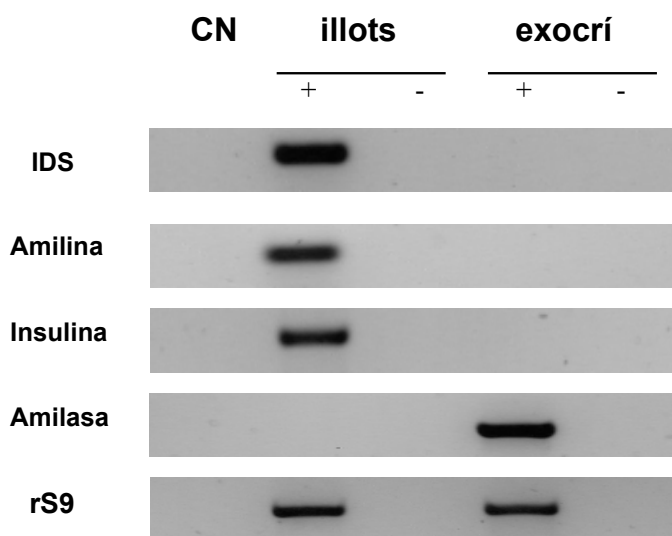


Figura 1.2.- RT-PCR d'illots pancreàtics i teixit exocrí humà.

S'ha fet la reacció de PCR a cada mostra per la detecció dels gens: IDS, amilina, insulina, amilasa i la proteïna ribosomal S9 (rS9). Cada amplificació de PCR s'ha fet amb la mostra tractada amb l'enzim transcriptasa reversa (+) i sense la transcriptasa reversa (-), com a control del DNA genòmic present a la mostra. Com a control de la reacció de PCR s'ha amplificat la mostra contenint H₂O enlloc del cDNA (CN). El tamany específic de cada banda es representa a la Taula 1.1 (veure Objectiu I).

2.2.- EXPRESSIÓ DE L'IDS AL TEIXIT PANCREÀTIC DE RATOLÍ

Per tal d'analitzar l'expressió de l'IDS al teixit pancreàtic de ratolí, s'ha seguit exactament el mateix protocol experimental utilitzat per les mostres humanes. S'han amplificat els mateixos gens, tot i que els oligonucleòtids (*primers*) dissenyats contenen la seqüència específica per ratolí, a excepció de la insulina i la proteïna ribosomal S9, on la seqüència dels *primers* és homologa per les dues espècies (Taula 1.3).

El resultat obtingut al teixit pancreàtic de ratolí (Figura 1.3), no difereix de l'obtingut anteriorment a les mostres de teixit humà. Així, l'expressió de l'IDS al teixit pancreàtic de ratolí es localitza als illots, mentre que al teixit exocrí no es detecta el mRNA d'IDS. En aquest cas, a partir de les diferents gens amplificats, també es pot comprovar la puresa dels teixits.

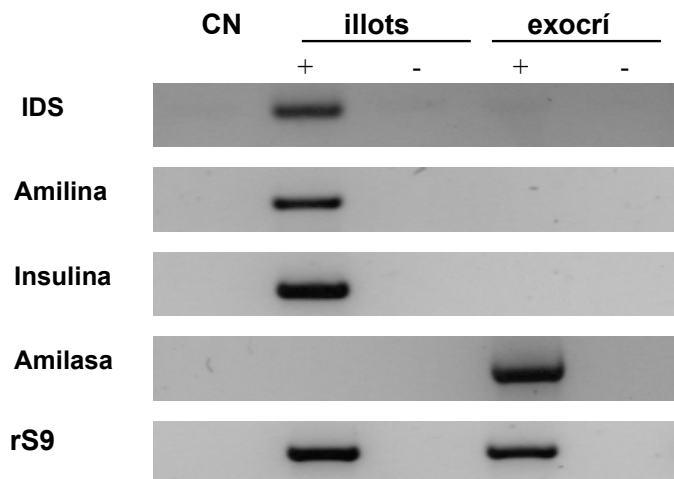


Figura 1.3.- RT-PCR d'illots pancreàtics i teixit exocrí de ratolí.

En cada mostra, s'ha amplificat el gen de l'IDS per localitzar la seva expressió, el gen de l'amilina i la insulina com a controls del illots pancreàtics, el gen de l'amilasa com a control del teixit exocrí i el gen de la proteïna ribosomal S9 (rS9) com a control de la integritat del mRNA de les mostres. Els parells de bases corresponents a cada banda es mostren a la Taula 1.2 (veure Objectiu I).

2.3.- EXPRESSIÓ DE L'IDS A LÍNIES CEL·LULARS

Un cop determinat que l'IDS es localitza als illots pancreàtics, per tal de conèixer si la seva expressió es detecta només a les cèl·lules β pancreàtiques, o bé, es localitza també a altres tipus cel·lulars de l'illot, s'ha analitzat l'expressió de l'IDS mitjançant RT-PCR a les línies cel·lulars pancreàtiques de ratolí: MIN6 i α TC1, productores d'insulina i glucagó respectivament.

Es pot observar a la Figura 1.4 que el mRNA de l'IDS es detecta tant a cèl·lules β (MIN6) com a cèl·lules α (α TC1). La puresa de cada línia cel·lular s'ha comprovat mitjançant l'amplificació dels gens de l'amilina i la insulina a les cèl·lules MIN6 i el glucagó a les cèl·lules α TC1.

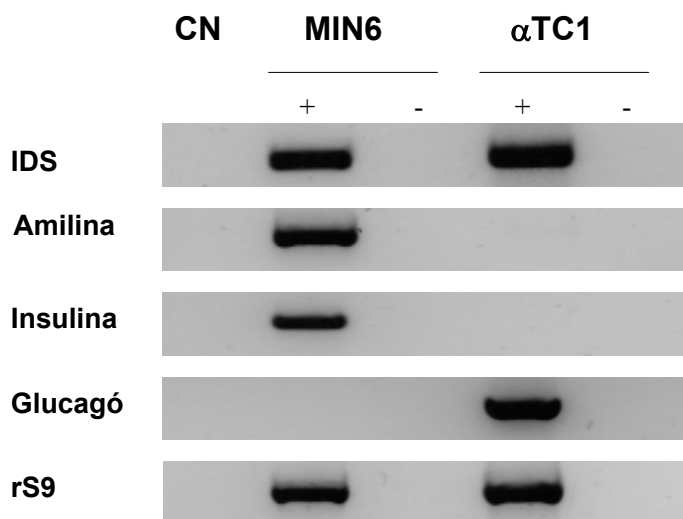


Figura 1.4.- RT-PCR de línies cel·lulars pancreàtiques de ratolí.

S'han amplificat per PCR els gens de l'IDS, amilina, insulina, glucagó i la proteïna ribosomal S9 (rS9) a mostres de cDNA procedents de les línies cel·lulars de ratolí: MIN6, cèl·lules β productores d'insulina i α TC1, cèl·lules α productores de glucagó. La mida específica de cada banda es representa en la Taula 1.2 (veure Objectiu I).

2.4.- LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE L'IDS

La localització subcel·lular de l'IDS mitjançant el mètode d'immunofluorescència indirecta, no es va poder dur a terme, degut a la dificultat per detectar l'IDS endogen, mitjançant l'anticòs policlonal contra aquesta proteïna, que havia estat produït per la casa comercial *Genosys* (veure Material i Mètodes I). Per aquest motiu, es va optar per subclonar el cDNA complet de l'IDS en el vector de la proteïna verda, tal i com es detalla en la secció de Materials i Mètodes I, a fi de poder detectar la proteïna IDS gràcies a la fluorescència emesa per la proteïna verda (EGFP).

Per comprovar la correcta biosíntesi i per tant, l'expressió de la proteïna fusió IDS-EGFP a una línia cel·lular β pancreàtica, es va transfectar aquesta construcció a cèl·lules MIN6 (les quals s'ha mostrat anteriorment per RT-PCR que expressen l'IDS), i es detectaren els productes genètics mitjançant *western blot* (Figura 1.5). L'expressió de la forma salvatge de l'IDS present a les cèl·lules MIN6 (carril 1), no s'ha pogut detectar, degut a que la reactivitat de l'anticòs utilitzat per detectar l'IDS, no és suficientment bona (de la mateixa manera que no s'havia pogut detectar l'IDS per immunofluorescència).

Per poder detectar i comparar el pes molecular de la proteïna IDS i de l'híbrid IDS-EGFP, es varen transfectar les cèl·lules amb una construcció gènica que contenia el cDNA de l'IDS, de manera que al augmentar l'expressió de l'IDS, l'anticòs anti-IDS era capaç de detectar la proteïna. Es pot observar que la banda corresponent a la proteïna IDS-EGFP es troba lleugerament per sobre la banda corresponent a la proteïna IDS, com a conseqüència del pes molecular de la proteïna verda (EGFP, 27 kDa). Els pesos moleculars observats són pròxims als esperats segons la seqüència d'aminoàcids: entre 55 i 45 kDa la forma madura de l'IDS (carril 3) i al voltant dels 80 kDa la proteïna fusió IDS-EGFP (carril 2).

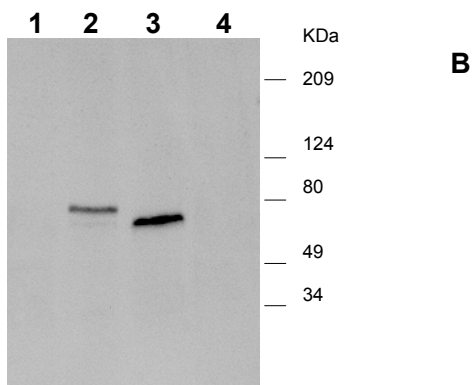
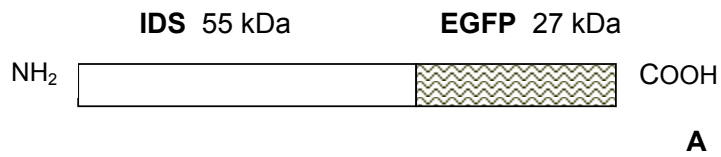


Figura 1.5.- Resultat de la construcció de la proteïna IDS amb la proteïna fluorescent verda (EGFP). (A) Representació de la proteïna fusió IDS-EGFP. (B) Electroforesi en gel de poliacrilamida 10 % amb SDS i posterior transferència a membrana de nitrocel·lulosa. Detecció per western blot de la proteïna IDS a cèl·lules MIN6 (1) cèl·lules MIN6 transfectades de forma transitòria amb el constructe que conté el cDNA de IDS-EGFP (2), cèl·lules MIN6 transfectades amb el constructe que conté el cDNA de l'IDS (3) i cèl·lules MIN6 transfectades amb el constructe que conté el cDNA del EGFP (4). La immunoreactivitat i la immunodetecció s'ha realitzat amb l'anticòs policlonal IDS (1:1000), seguida de l'anticòs secundari conjugat amb la peroxidasa (Dako) (1:2500) i revelat pel mètode de la quimioluminescència (ECL). Els pesos moleculars patrons s'indiquen a la dreta de la figura.

La localització subcel·lular de l'IDS a cèl·lules β pancreàtiques (cèl·lules MIN6) es mostra a la Figura 1.6. En primer lloc, s'analitzà l'expressió de la proteïna

fusió IDS-EGFP mitjançant el microscopi confocal. Com s'observa a la Figura 1.6A, s'obté un patró puntejat típic de les proteïnes localitzades als lisosomes.

Per comprovar-ho s'ha realitzat a la mateixa mostra una tinció immunofluorescent amb un anticòs policlonal contra una proteïna específica de lisosomes, com és el LAMP-2 (proteïna de membrana associada als lisosomes). Per tal de poder colocalitzar el IDS-EGFP i el LAMP-2, l'anticòs secundari utilitzat per aquesta segona tinció, està marcat amb fluorescència TRITC (s'obté la imatge en vermell) (Figura 1.6B).

La colocalització demostra que la fluorescència emesa per la proteïna verda, unida al IDS, i la fluorescència que prové de la proteïna lisosomal LAMP-2, coincideixen. Per tant, la localització subcel·lular de l'IDS a cèl·lules β pancreàtiques és clarament lisosomal. Tot i que l'IDS no es detecta a tots els lisosomes.

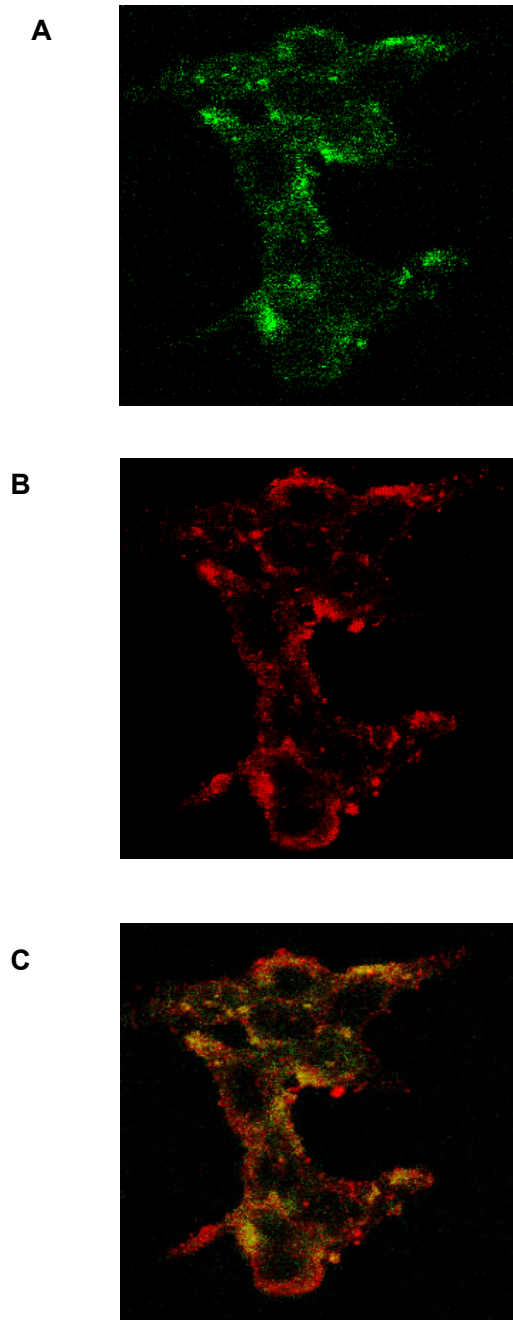


Figura 1.6.- Colocalització de l'IDS a la línia cel·lular MIN6. (A) Localització de la proteïna fusió IDS-EGFP. (B) Localització de la proteïna lisosomal LAMP-2 i (C) la seva colocalització amb IDS-EGFP.

3.- DISCUSSIÓ I

En aquesta part del treball s'ha demostrat que l'iduronat-2-sulfatasa es localitza als illots pancreàtics, mentre que al teixit exocrí no es detecta la seva expressió.

La integritat del mRNA dels diferents teixits utilitzats, teixit exocrí i illots de Langerhans, s'ha comprovat mitjançant l'amplificació del gen de la proteïna ribosomal S9, la qual s'expressa constitutivament a tots el teixits (253). En aquest sentit, la puresa de les mostres utilitzades també s'ha analitzat mitjançant l'amplificació de diversos gens específics de cada teixit, com es mostra als Resultats I. Aquestes amplificacions demostren que no hi ha contaminació d'altres teixits a les mostres utilitzades per la localització de l'IDS.

Estudis previs havien detectat l'expressió de l'IDS a pàncreas humà, entre d'altres teixits (219) i als illots pancreàtics humans (245). En aquest darrer estudi havien identificat que l'expressió de l'IDS als illots pancreàtics era molt més abundant a l'existent al teixit exocrí. En els nostres resultats però, no s'ha detectat expressió d'IDS al teixit exocrí. Aquest fet podria haver estat com a conseqüència de la baixa abundància de mRNA d'IDS que hi hauria al teixit exocrí, de manera que hagués estat indetectable mitjançant la tècnica de RT-PCR.

La no detecció dels transcrits d'IDS al teixit exocrí indica que l'IDS es localitza de forma diferencial al teixit pancreàtic, en relació als illots i al teixit exocrí. Aquest fet contradiu els estudis que suggerien que l'IDS s'expressa constitutivament a tots els teixits, amb baixos nivells de transcripció, com a conseqüència de contenir en la regió promotora del gen, dues caixes consens GC enlloc de les seqüències consens TATA o CAAT (208).

Cal remarcar que la localització de l'IDS al teixit pancreàtic no depèn de l'espècie en qüestió. Els resultats obtinguts en aquest objectiu indiquen que el patró d'expressió de l'IDS és el mateix tant per les mostres procedents de teixit humà com per les de ratolí. El fet que l'IDS conservi la seva localització a l'illot pancreàtic a diferents espècies, reforça la idea que l'IDS compleix una funció important a l'illot pancreàtic .

És ben conegut que l'IDS és un component dels lisosomes als fibroblasts (221). Per tal de comprovar que la localització de l'IDS als illots pancreàtics no és deguda a una possible contaminació de fibroblasts als illots en el moment del seu isolament, s'ha amplificat l'IDS a línies cel·lulars pures com MIN6 (derivades d'insulinoma de ratolí transgènic) (248) i α TC1 (procedents d'adenoma pancreàtic creat en ratolí transgènic) (249), les qual no contenen fibroblasts. La detecció de l'IDS en aquestes línies cel·lulars indica que la localització de l'IDS als illots pancreàtics no prové dels fibroblasts.

Dins de l'illot pancreàtic, l'IDS es localitza a les cèl·lules α (productores de glucagó) i a les cèl·lules β (productores d'insulina). El fet de detectar l'IDS als dos tipus cel·lulars, suggereix que aquest enzim no té una funció específica a la cèl·lula β , sinó que afectaria a la funció de l'illot en general.

La localització lisosomal de l'IDS s'ha descrit a diferents tipus cel·lulars, com a fibroblasts i a cèl·lules neuronals (208,221,254), però no s'ha descrit mai als illots pancreàtics. En aquesta part de la tesi es localitza l'IDS als lisosomes de les cèl·lules β pancreàtiques. Aquest fet suggereix que l'IDS es dirigeix als lisosomes a través dels receptors de manosa-6-fosfat, per la qual cosa la seva síntesi i el seu processament a la cèl·lula β , tindrien lloc de forma similar als altres tipus cel·lulars descrits fins al moment (208,254).

La localització subcel·lular de l'IDS s'ha realitzat mitjançant la transfecció del constructe format per l'IDS i la proteïna fluorescent verda (IDS-EGFP), a cèl·lules MIN6. L'ús de la proteïna fusió GFP té diverses aplicacions, com: marcador per a l'expressió gènica (255), per l'estudi de la formació cel·lular durant el desenvolupament (256), com a marcador de proteïnes per a l'estudi de la seva localització (257), el seguiment del seu moviment o bé, per estudiar processos dinàmics de compartiments subcel·lulars en els quals es dirigeix la proteïna (258). La proteïna fluorescent verda (GFP) prové de l'organisme *Aequorea victoria*. L'avantatge d'aquesta molècula bioluminescent sobre d'altres, és el fet que pot operar independentment de cofactors (259). Tot i que es coneixen les seves propietats des de fa anys, no va ser fins al 1992 quan es va clonar el cDNA del GFP (260).

La proteïna que s'ha fusionat amb l'IDS és una modificació del GFP, anomenada EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) (261), on s'han modificat certs aminoàcids, provocant que la proteïna tingui un únic pic d'excitació i sigui capaç de plegar-se més ràpidament que la proteïna salvatge (GFP), de manera que s'escurça el temps entre la síntesi i la fotoactivitat de la proteïna i emet la fluorescència amb major intensitat. La transfecció de la proteïna fluorescent verda mostra un marcatge uniforme al nucli, tal i com previs estudis del nostre grup han demostrat a cèl·lules COS7 (262) i com s'ha observat a altres tipus cel·lulars (258).

La malaltia mucopolisacaridosis tipus II (MPS II), causada per un defecte en l'enzim iduronat-2-sulfatasa, mostra una disfunció neurològica progressiva. És coneix també, que el teixit que mostra una expressió més abundant de l'IDS és el cervell, per tant, aquestes troballes indiquen que l'IDS tindria un paper important al sistema neuronal. D'altra banda, és ben conegut, que tot i els diferents orígens embriològics, la cèl·lula β i les cèl·lules neuronals comparteixen una gran similitud,

de fet, existeix un gran numero de molècules que s'expressen en aquests dos tipus cel·lulars (263), com és el cas de l'iduronat-2-sulfatasa. Per tant, aquest seria un argument més que donaria suport a que l'IDS juga un paper essencial a l'illot pancreàtic.

OBJECTIU II:

**INVESTIGAR ELS SENYALS METABÒLICS QUE
REGULEN L'EXPRESSIÓ DE L'IDURONAT-2-
SULFATASA A L'ILLOT PANCREÀTIC.**

En base a la hipòtesi de treball proposada, un dèficit de l'expressió de l'IDS podria donar com a conseqüència una variació del metabolisme dels proteoglicans, la qual cosa, provocaria una alteració de la funció secretora de l'illot i al mateix temps podria afavorir el procés d'amiloidogènesi a l'illot. Si aquest fos el cas, les substàncies implicades en la regulació de l'enzim, podrien ser útils per inhibir la precipitació de fibretes d'amiloid i la conseqüent formació dels dipòsits.

Els dipòsits d'amiloid estan associats a la diabetis tipus 2 que, entre altres alteracions metabòliques, produeix hiperglicèmia. Per aquest motiu, el propòsit d'aquest segon objectiu ha estat el d'estudiar la regulació del gen IDS per la glucosa i identificar quins són els senyals intracel·lulars a través dels quals, la glucosa regula el contingut de mRNA de l'IDS als illots pancreàtics.

Objectius específics

- Investigar els senyals metabòlics implicats en la regulació per la glucosa del mRNA de l'iduronat-2-sulfatasa a illots pancreàtics humans i de ratolí.
- Estudiar simultàniament el paper que tots aquests processos tenen sobre la regulació del mRNA de l'amilina i el perlecan.
- Comparar la regulació de l'IDS i el perlecan entre dues espècies, com la humana i la de ratolí.

Disseny experimental

El model cel·lular emprat per aquest projecte és el d'un cultiu primari d'illots pancreàtics isolats. El protocol experimental que s'ha dut a terme, ha estat el mateix pels illots procedents de l'espècie humana i pels illots de ratolí.

1. Extracció i isolament d'illots pancreàtics humans i de ratolí.
2. Precultiu de 16 hores en medi RPMI-1640 amb glucosa a 11,1 mM.
3. Cultiu de 24 hores amb medi RPMI-1640 suplementat amb les substàncies problema detallades a la Taula 2.1.
4. Extracció del RNA i síntesi del cDNA dels illots.
5. Quantificar l'expressió del mRNA de l'IDS, amilina i perlecan, per PCR a temps real.
6. Anàlisi i càlcul dels resultats.

A continuació es detallen les diferents substàncies afegides al medi de cultiu.

Els *primers* i les sondes dissenyades per l'amplificació de cada gen, es mostren a la següent secció (Material i mètodes II).

Substància	Concentració	[glucosa]	Estudi de
D-glucosa (G)	3; 5; 11,1; 16,7; 24,4 mM		Metabolisme
Gliceraldehid (GL)	1 mM	3 mM	Metabolisme
Manoheptulosa (MH)	21,4 mM	24,4 mM	Metabolisme
6-deoxiglucosa (6-DG)	21,4 mM	3 mM	Metabolisme
Actinomicina D (AC)	5 µg/ml	3; 24,4 mM	Transcripció gènica
Ciclohexamida (CH)	20 µg/ml	24,4 mM	Síntesi proteica

Taula 2.1. Es mostren les diferents condicions experimentals realitzades per l'estudi de la regulació de l'IDS, l'amilina i el perlecan als illots pancreàtics de ratolí i humans.

1. MATERIALS I MÈTODES II

1.1.- CULTIU D'ILLOTS

❖ Reactius

- Medi de cultiu per illots

RPMI-1640	500 ml
FCS (Sèrum fetal boví, inactivat)	10% (v/v)
D-glucosa	2 g/l
penicil·lina	100 U/ml
estreptomicina	100 µg/ml
L-glutamina	2 mM
- D-glucosa
- Manoheptulosa
- Gliceraldehid
- Manosa
- 6-desoxiglucosa
- Actinomicina
- Cicloheximida

❖ Equipament i material

- Campana d'esterilitat de fluxe laminar
- Lupa binocular
- Incubador de cultiu
- Plaques de petri de 60 mm de diàmetre

❖ Procediment

1. Un cop s'han extret i purificat els illots pancreàtics (Materials i Mètodes I 1.1 i 1.2), aquests es reparteixen en grups de 100 i es "precultiven" durant 16h en plaques de Petri que contenen 8 ml de medi de cultiu RPMI-1640 per illots amb una concentració de glucosa de 11,1 mM. Els illots es mantenen en cultiu a 37°C en una atmosfera humificada d'aire: CO₂ (95% : 5%). Aquest període de

percultiu té la finalitat d'eliminar la variabilitat entre preparacions d'illots provinents de pàncreas diferents, així com la recuperació funcional de l'illot.

2. Passat aquest temps, es retira el medi de cultiu dels illots i s'afegeix 10 ml de medi de cultiu RPMI-1640 suplementat amb la substància adient per a cada concentració experimental, com es mostra en la Taula 2.1.
3. En finalitzar el temps de cultiu programat per a cada condició experimental, es recullen els illots sota la lupa binocular. Els illots destinats per l'estudi de la regulació (extracció de RNA), es recullen en un tub eppendorf autoclavat i es centrifuguen a 500 g durant 5 min. S'aspira el medi deixant-los el màxim secs possibles i es congelen ràpidament amb neu carbònica. Es guarden a -80°C fins a la seva utilització.

1.2.- PCR A TEMPS REAL

La regulació de l'expressió de l'IDS, amilina i perlecan, als illots humans i de ratolí, sota diverses condicions experimentals, s'ha realitzat mitjançant la PCR a temps real.

❖ Reactius

- Sondes específiques TaqMan®
- Oligonucleòtids específics (primers)
- TaqMan® Universal Master Mix
- H₂O desionitzada
- Control endogens: β -actina i 18S (Applied Biosystems)

❖ Equipament i material

- ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System
- Programa Primer Express®
- Plaques de 96 pous i taps òptics
- Pipetes i puntes amb filtre

❖ Procediment

1.2.1.- BASES DE LA QUANTIFICACIÓ

Anteriorment a aquesta metodologia per quantificar els àcids nucleics calia fer: Northern, per el RNA o PCR semiquantitativa, per el DNA. Tots dos casos es tracta d'un procés llarg i amb el principal inconvenient d'haver de treballar amb radioactivitat, en el primer cas.

La PCR quantitativa es caracteritza en que la mesura es realitza a **temps real**, mitjançant la quantitat de fluorescència que s'ha generat, enlloc de fer-ho a temps final a partir del producte de PCR acumulat. A la següent Figura 2.1 es mostra una amplificació simple mostrant els termes més comuns utilitzats per la PCR a temps real.

L'amplificació es representa segons la senyal emesa de fluorescència (R_n) versus el nº de cicles de la PCR. En els cicles inicials, hi ha molt poc canvi de la senyal de fluorescència, és on es defineix la **línia basal** (baseline). L'amplificació del control negatiu, que conté H_2O enlloc de DNA patró (anomenat NTC: *no template control*), mostra una línia corresponent a la basal durant els 40 cicles. En canvi, a les mostres, quan comença a haver-hi una acumulació del producte de PCR s'observa un increment de fluorescència que supera la línia basal.

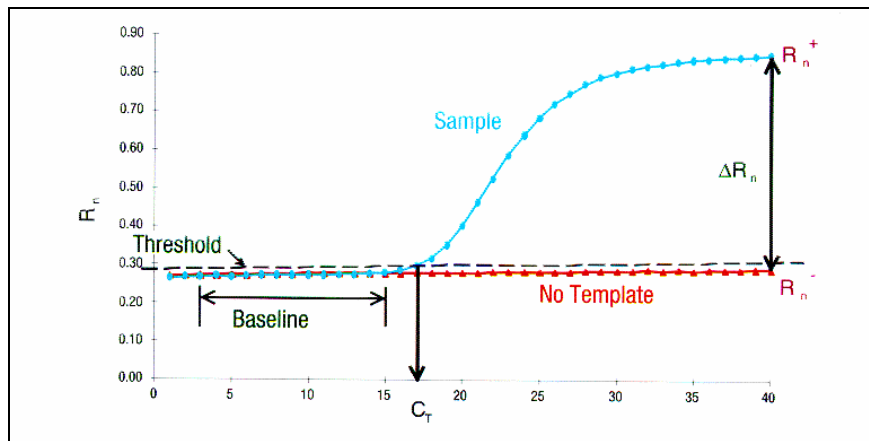


Figura 2.1. Amplificació d'una mostra problema mitjançant PCR a temps real.

En tota amplificació, es fixa una **línia llindar** (threshold) lleugerament per sobre la línia basal. El paràmetre **cicle llindar: C_T** , es defineix com el cicle de la PCR en el qual la quantitat de fluorescència emesa correspon a la línia llindar fixada, o sigui, correspon al cicle de la PCR on es troba la intersecció entre la corba de fluorescència de la mostra i la línia llindar. El ΔR_n correspon a la quantitat màxima de fluorescència emesa per la mostra al final dels cicles.

La quantificació de la mostra problema es realitza comparant el C_T obtingut de la mostra en una **corba patró**, on es coneix la quantitat de DNA corresponent als diferents C_T .

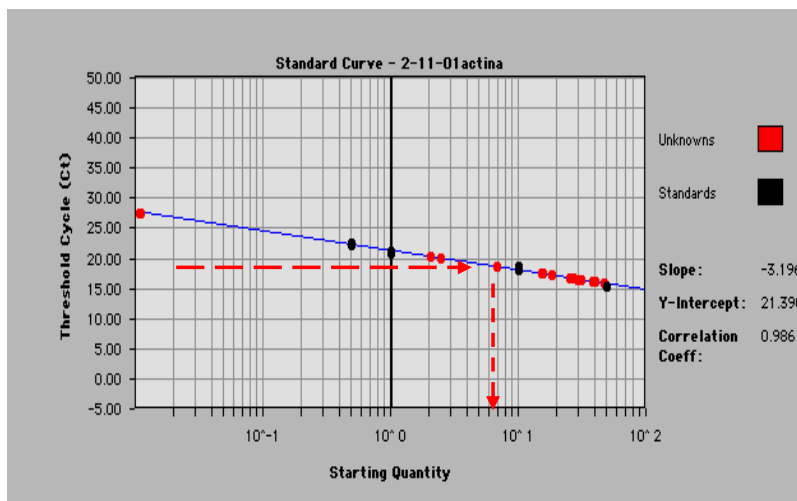
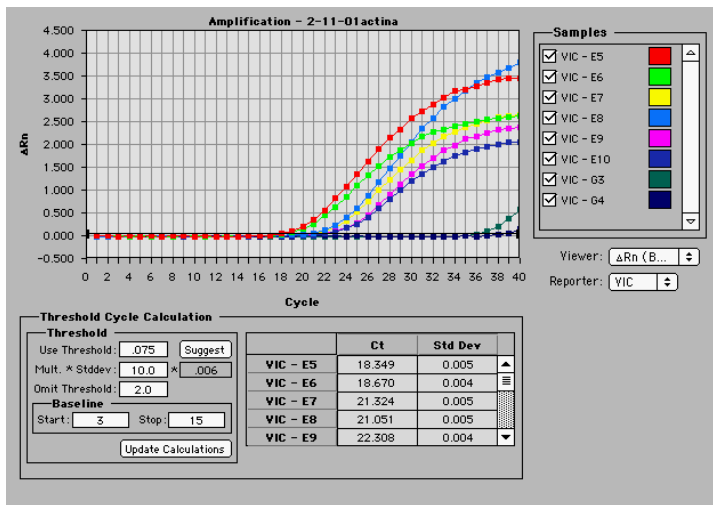


Figura 2.2. Càlcul de la C_T mitjançant la corba patró. La primera gràfica representa l'amplificació de diferents dilucions d'una mateixa mostra en que es coneix la seva concentració o dilució. En la segona gràfica es representa la corba estàndard (punts negres) on s'hi extrapola el C_T de la mostra problema (punts vermells) i s'obté la seva quantitat.

Forma de detecció: Sondes TaqMan®

Permet la detecció específica del producte amplificat. La sonda és un oligonucleòtid amb una seqüència complementària al DNA a amplificar i es troba situada entre els dos *primers*. Es caracteritza per estar marcada amb dos fluorescents:

Reporter o Emissor (R): A l'extrem 5'. És el que emet la senyal al alliberar-se.

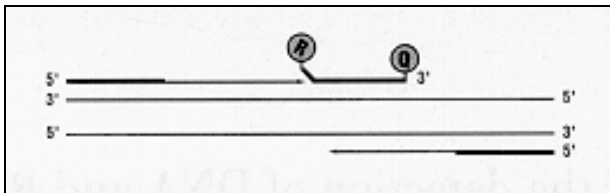
Quencher o Amortiguador (Q): Bloqueja l'extrem 3', evitant que la sonda actuï com a primer. Anul·la la fluorescència emesa pel *reporter* quan es troben pròxims.

Els fluorocroms utilitzats pel marcatge de les sondes a l'extrem 5', com a *reporter* han estat el 6-FAM ($\lambda_{\text{màx}} = 520 \text{ nm}$) pel marcatge de les sondes corresponents al gen d'interès a quantificar i el VIC ($\lambda_{\text{màx}} = 550 \text{ nm}$) utilitzat per marcatge de les sondes del gen endògen. El fet d'utilitzar dos fluorocroms diferents, ha permès realitzar en un mateix tub la quantificació del endògen i del gen problema de la mostra, el que s'anomena *PCR Multiplex*. El fluorocrom utilitzat pel marcatge a l'extrem 3' de la sonda, com a Quencher ha estat el TAMRA ($\lambda_{\text{màx}} = 580 \text{ nm}$).

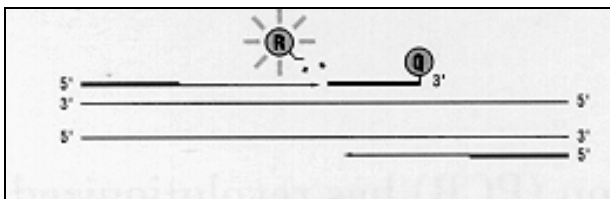
Durant el procés d'amplificació, quan la seqüència d'interès es troba present, s'hi uneix en primer lloc la sonda i posteriorment els dos encebadors, degut a la diferència de temperatura d'hibridació. En aquestes condicions, la sonda no emet fluorescència degut a la proximitat entre els dos fluorocroms (el procedent del reporter i el del quencher). Es comencen a sintetitzar les noves cadenes de DNA, fins que arriben al lloc de la seqüència on s'ha hibridat la sonda. En aquest moment,

la DNA polimerasa utilitzada per aquesta reacció (*AmpliTaq Gold*) degut a l'activitat 5'-3' nucleasa que posseeix, comença a degradar la sonda i per tant s'allibera el fluorocrom emisor (*reporter*), aquesta fluorescència es la que detecta l'aparell. Finalment la sonda és totalment desplaçada per la nova cadena de DNA sintetitzada.

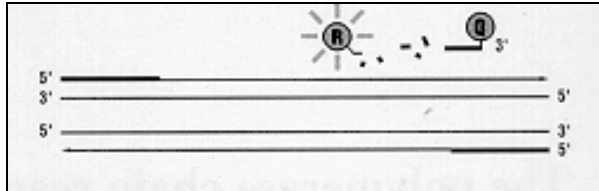
Polimerització i Extensió: S'uneixen els primers i la sonda, es comencen a sintetitzar les noves cadenes de DNA fins arribar on es troba situada la sonda.



Alliberament: S'allibera el fluorocrom de l'extrem 5' de la sonda i al separar-se del *quencher* emet fluorescència. Es comença a degradar la sonda degut a l'activitat 5'-3' nucleasa de la DNA polimerasa.



Polimerització completa: Finalitza la degradació de la sonda i la completa síntesi de la nova cadena de DNA.



Aquest procés succeeix cada cicle, per tant l'increment de fluorescència és proporcional a la quantitat de producte de PCR amplificat. Les sondes TaqMan® permeten detectar específicament la seqüència d'interès, altres artefactes com la unió de primers no generen senyal. Un altre avantatge és el fet que podem marcar les sondes amb diferents fluorocroms, així, en una mateixa PCR podem detectar dues seqüències diferents utilitzant sondes amb diferents marcatges. L'únic problema que presenta l'ús de sondes TaqMan®, és que es cal sintetitzar cada sonda per detectar una determinada seqüència.

1.2.2.- DISSENY DE L'EXPERIMENT I OPTIMITZACIÓ

Per quantificar correctament l'expressió del gen d'interès cal considerar i optimitzar diferents aspectes relacionats amb la PCR. Els passos a seguir són els següents:

1. DNA motlle

En aquest treball, el cDNA motlle a amplificar prové dels illots pancreàtics humans o de ratolí que han estat cultivats amb diferents condicions. Tot i que es tracta d'una tècnica molt sensible, és necessari que el DNA es trobi a una concentració mínima (10000 còpies), per tal d'obtenir senyal entre els cicles 25-30.

2. Disseny dels primers (encebadors) i de la sonda TaqMan®

Tant el disseny dels primers com el de la sonda es realitza a partir del programa Primer Express®, que els selecciona automàticament seguint els següents paràmetres:

- L'allargada del fragment a amplificar (amplicó) ha de ser de 50-150 parells de bases
- Per evitar l'ús de la DNasa, cal que la sonda estigui situada entre dos exons
- La regió a amplificar ha de contenir una proporció del 20-80% de GC
- Evitar regions on hi ha més de tres bases iguals seguides, sobretot en el cas de Gs
- Primer s'ha d'unir la sonda i després els primers, per tant la T_m de la sonda ha de ser 10°C per sobre la T_m dels primers. Es recomana una T_m per la sonda de 68-70°C i una T_m pels primers de 58-60°C
- La sonda no pot contenir una G a l'extrem 5'
- Els primers, als últims 5 nucleotids de l'extrem 3', no hi poden haver-hi més de 2 bases G o C.

IDS	RATOLÍ	HUMÀ
Primer 5'	GGCATCCCATAGCGTTCTCTT	CCCACAGCCTCCTCTTCCA
Primer 3'	CCAACCGACATGGTCACGTA	TGTCAGGTCTCCTGCCAGTG
Sonda	ATGCGTTTGCAGCAAGCAGTG	
Nº pb	201	90
Amilina	RATOLÍ	HUMÀ
Primer 5'	CTCCAAACTGCCAGCTGTCC	GGCATCCTGAAGCTGCAAGTA
Primer 3'	TCCGTTTGTCCATCTGAGGG	CGTTGCACATGTGGCAGTGT
Sonda	TCATCCTCTCTGTGGCACTGAACCACTTG	CATTGAAAGTCATCAGGTGGAAAAGCGG
Nº pb	101	122
Perlecan	RATOLÍ	HUMÀ
Primer 5'	GGCCGGGCTCACAGTGT	CCATGGATACCACCGTCACC
Primer 3'	GCACTCGGGTGAAGTGGG	GCACCCGAGTGAAGTGGG
Sonda	AGTGCAGATGCCCCATTGGCTATTCTG	
Nº pb	73	125

Taula 2.2. Es mostren els primers i les sondes dissenyades per a la quantificació dels diferents gens estudiats a l'objectiu II de la tesi. *També es mostra el disseny de primers i sonda de la insulina, que s'ha utilitzat a l'objectiu III.

1. Condicions Universals

Tots els assaigs quantitativs es realitzen amb el mateix cicle de temperatures, això permet que no sigui necessari cap optimització del cicle i que es puguin analitzar diferents gens a la mateixa placa.

Activació	50°C	2 min	
	95°C	10 min	} 40 cicles
Desnaturalització	95°C	15 seg	
Hibridació / Extensió	60°C	1 min	

A més del cicle, també s'utilitza com a condició universal la mescla de reactius comuns (*master mix*) subministrada per la casa comercial, conté: DNA polimerasa AmpliTaq Gold, dNTPs, MgCl₂, tampó de la DNA polimerasa. D'aquesta forma augmenta la reproductibilitat, ja que es redueixen errors per pipeteig.

2. Optimització dels primers i de la sonda

Per saber la concentració òptima de primers que cal utilitzar, es crea una matriu de concentracions que consisteix en fer la reacció de PCR amb tots els paràmetres fixats, amb un excés de sonda i només variant la concentració de primers de 50-900 nM. Es considera com a concentració òptima la que obté una amplificació amb el C_T més baix i el màxim de fluorescència (ΔR_n).

Un cop determinat la concentració dels primers, es fa el mateix però en aquest cas variant la concentració de sonda entre 50-200 nM. El criteri per escollir la concentració òptima de la sonda és el mateix que pels primers.

1.2.3.- CONTROLS I CORBES PATRÓ

Els controls i les corbes patró necessàries per a duu a terme la quantificació d'un gen en concret, son les següents:

1. *Corba patró*

Per poder quantificar el nostre sistema experimental cal tenir una referència coneguda, per aquest motiu és necessari construir una recta patró. Com que en aquesta tesi totes les quantificacions han estat relatives, o sigui, s'expressen en relació a una base, les rectes patró s'han fet mitjançant dilucions seriades d'una mostra de DNA d'alta concentració que contenia el gen problema a quantificar. Aquesta mostra de DNA s'obté a partir de construccions plasmídiques que contenen parcialment la seqüència del gen, o sigui, després d'extreure el RNA dels illots humans o de ratolí, els fragments generats per la RT-PCR utilitzant els mateixos primers dissenyats per la PCR a temps real, són clonats al vector de clonació pGEM-Teasy.

2. *Control endògen*

Per normalitzar les quantificacions del gen d'interès cal mesurar a la mateixa mostra un gen endògen, l'expressió del qual no varia a les diferents condicions que ha estat exposat. En aquest treball s'ha utilitzat la β -actina per les mostres d'illots humans i el 18S Ribosomal per les mostres d'illots de ratolí. Com en el cas anterior, per quantificar el gen endògen es construeix una recta patró, en aquest cas el DNA del que es parteix per fer les dilucions seriades, provenia de cDNA de les línies cel·lulars: MIN6 per la quantificació de 18S de ratolí i DAUDI per la de β -actina de les mostres humanes.

3. NTC (No Template Control)

Control que enlloc de DNA motlle conté H₂O.

4. Replicats

Cal fer diferents mesures de la mateixa mostra, per comprovar la reproductibilitat.

1.2.4.- PROCEDIMENT: AMPLIFICACIÓ DE LES MOSTRES

Un cop s'han considerat els paràmetres descrits fins al moment, es duu a terme l'amplificació del gen d'interès:

1. Preparar la reacció de PCR. Igual que la PCR convencional es prepara la mescla en un tub eppendorf, afegint tots els reactius a excepció del DNA. Les mescles a preparar són les següents:

GEN PROBLEMA	CONCENTRACIÓ FINAL
TaqMix (x2)	12,5 µl (x1)
Primer 5'	50-900 nM
Primer3'	50-900 nM
Sonda	50-200 nM
cDNA	10-100 ng
H ₂ O	Vf 25 µl

GEN ENDÒGEN	CONCENTRACIÓ FINAL
TaqMix (x2)	12,5 µl (x1)
Mescla endògen* (x20)	1,25 µl (x1)
CDNA motlle	10-100 ng
H ₂ O	Vf 25 µl

*Conté la mescla de primers i sonda, subministrat per la casa comercial.

2. Es reparteix la mescla en els diferents “pouets” de la placa i s’afegeix el DNA, de manera que per cada amplificació cal que hi hagi: el control (NTC); la corba patró (STD) i la mostra (UNK). Per quantificar l’expressió del gen endògen hi ha dues possibilitats:
 - a) Realitzar l’amplificació en “pouets” separats, utilitzant com a mostra la mateixa que per l’anàlisi del gen d’interès.
 - b) Realitzar l’amplificació del gen endògen en el mateix tub que el gen d’interès, és el que s’anomena PCR Multiplex. És una avantatge quan la quantitat de cDNA mostra que es pot aconseguir és limitada, com és en el cas dels illots humans. Cal tenir present que les dues sondes, amb les que es treballa conjuntament, han d’estar marcades amb diferents fluorocroms.
3. Finalment es tapen els tubs amb els taps òptics i s’introdueix la placa a l’aparell ABI PRISM 7700 perquè tingui lloc el cicle de la PCR.

1.2.5.- INTERPRETACIÓ DELS RESULTATS I CÀLCULS

Un cop finalitzada la reacció, l'aparell calcula automàticament la recta patró i a partir d'aquesta mostra la concentració de cada mostra, com es representa en la Figura 2.2. A continuació es detallen els càlculs a seguir:

1. Es calcula la concentració mitjana i la desviació estàndard dels diferents replicats per una mateixa condició. Tant pel gen problema com per l'endògen.
2. Es normalitzen els valors, fent el quocient entre la concentració del gen problema / concentració de l'endògen.
3. El valor normalitzat es refereix a un valor base, el qual se li assigna el 100%. En aquest estudi el valor de referència sempre ha estat el dels illots cultivats a 3 mM de glucosa.

2.- RESULTATS II

2.1.- REGULACIÓ DEL CONTINGUT DE mRNA D'IDS, AMILINA I PERLECAN ALS ILLOTS PANCREÀTICS DE RATOLÍ

Després d'un període de 24 hores de cultiu amb les diferents condicions experimentals, els illots pancreàtics presenten una viabilitat tintorial superior al 80% (tinció de bromur d'etidi / taronja d'acridina, com s'indica a Materials i Mètodes II)

Tots els oligonucleòtids dissenyats per l'amplificació dels gens a estudiar en aquest objectiu, es caracteritzen pel fet de trobar-se situats entre dos exons diferents del gen en qüestió, a fi d'evitar la contaminació procedent del DNA genòmic sense la necessitat de tractar les mostres amb DNasa. Els oligonucleòtids i la sonda dissenyats per cada gen es representa a la Taula 2.2 de Materials i Mètodes II.

2.1.1.- EFECTE DE LA GLUCOSA I PAPER DEL METABOLISME GLICOLÍTIC

mRNA D'IDS

Els illots s'han cultivat durant 24 hores en medi RPMI-1640 a diferents concentracions de glucosa: 3; 5,5; 11,1; 16,7 i 24,4 mM. Es pot observar a la Figura 2.3 com l'expressió de l'IDS augmenta en relació a la concentració de glucosa: $115,5 \pm 12\%$ a 5,5 mM; $140,2 \pm 20\%$ a 11,1 mM; $188 \pm 30\%$ a 16,7 mM i $279 \pm 54\%$ a 24,4 mM de glucosa, relatiu al 100% de mRNA d'IDS dels illots control cultivats a 3 mM de

glucosa. Els increments obtinguts a glucosa 16,7 i 24,4 mM són estadísticament significatius ($p \leq 0,01$).

A fi d'estudiar més concretament el paper del metabolisme glicolític en la regulació del contingut del mRNA d'IDS, s'ha analitzat l'efecte de diferents anàlegs de la glucosa.

El gliceraldehid és un component de la via glicolítica que s'incorpora a les trioses fosfat i és fosforilat en el carboni 3 mitjançant una quinasa dependent d'ATP. A una concentració d'1 mM i en presència de glucosa 3 mM no és capaç d'incrementar la quantitat de mRNA d'IDS dels illots ($75 \pm 34\%$ del contingut dels illots control).

La manoheptulosa competeix amb la glucosa per la unió al centre catalític de la glucoquinasa, provocant una inhibició reversible d'aquest enzim i, en conseqüència, una inhibició de la via glicolítica. Els illots s'han cultivat en presència de manoheptulosa (21,4 mM) i d'una concentració de glucosa de 24,4 mM. S'observa que la inhibició de la glicòlisi bloqueja l'efecte produït per la glucosa (24,4 mM) sobre el mRNA d'IDS. L'expressió d'IDS en presència de manoheptulosa és de $98 \pm 41\%$ relatiu al contingut de mRNA d'IDS dels illots control (3 mM glucosa), clarament inferior al $279 \pm 54\%$ obtingut en absència de manoheptulosa a 24,4 mM glucosa.

Finalment, els illots s'han cultivat amb un anàleg de la glucosa no fosforilable ni metabolitzable, la 6-desoxiglucosa, a una concentració de 21,4 mM en presència de 3 mM de glucosa. S'observa que el contingut de mRNA d'IDS és del $50 \pm 3\%$ relatiu al valor del cultiu control amb glucosa 3 mM.

mRNA D'AMILINA

A fi de verificar el mètode de quantificació utilitzat, la PCR a temps real, simultàniament a l'anàlisi de l'expressió de l'IDS i el perlecan, en els mateixos illots també s'ha mesurat el contingut de mRNA d'amilina.

Es pot observar a la Figura 2.1, que l'expressió de l'amilina és depenent de la concentració de glucosa present al medi. L'increment del mRNA d'amilina respecte els illots control cultivats a 3 mM de glucosa és el següent: 33% a 5 mM; 68% a 11,1 mM; 75% a 16,7 mM i el 182% a 24,4 mM de glucosa, sent significatius els increments a glucosa 11,1 mM i 16,7 mM ($p \leq 0,05$) i el de glucosa 24,4 mM ($p \leq 0,001$).

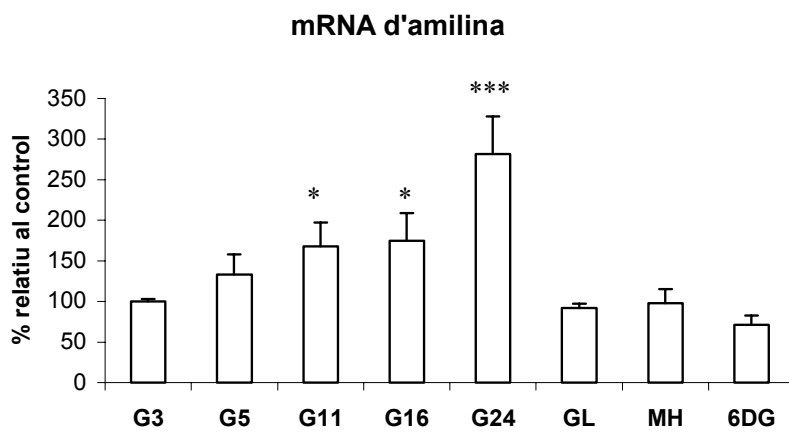
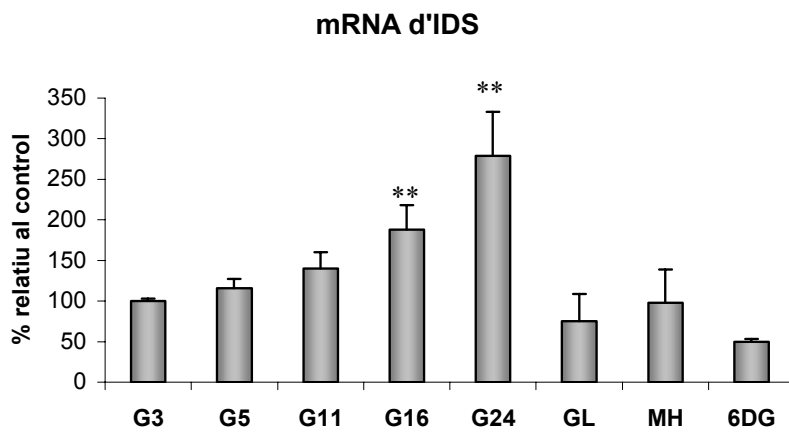
L'estudi del metabolisme glicolític en la regulació de l'expressió de l'amilina, mostra uns resultats molt similars als obtinguts en la regulació gènica de l'IDS. Quan els illots s'han cultivat a 3 mM de glucosa amb gliceraldehid (1 mM), no s'observa que el gliceraldehid sigui capaç d'incrementar l'expressió d'amilina, de la mateixa manera que ho produïa les altes concentracions de glucosa.

Al inhibir la via glicolítica amb l'addició de manohèptulosa (21,4 mM) al medi amb 24,4 mM de glucosa, es bloqueja significativament l'efecte estimulador provocat per una concentració elevada de glucosa. El contingut de mRNA d'amilina obtingut és comparable al dels illots control a 3 mM, $98 \pm 17\%$ comparat amb el $100 \pm 3\%$.

Els illots cultivats a 3 mM de glucosa i 21,4 mM de 6-desoxiglucosa, mostren un contingut de mRNA d'amilina de $71 \pm 12\%$ relatiu al valor detectat als illots control.

mRNA DEL PERLECAN

La glucosa no provoca cap modificació sobre l'expressió del perlecan, que es manté pràcticament constant. S'observa una variació respecte al control del 6%, 3%, 11% i 14% a 5,5; 11,1; 16,7 i 24,4 mM de glucosa respectivament.



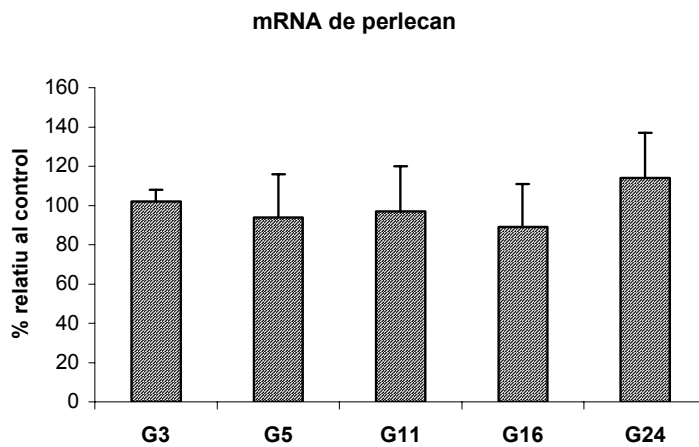


Figura 2.3. Efecte de la glucosa i diferents anàlegs de la glucosa en la regulació dels mRNA d'IDS, amilina i perlecan als illots de ratolí.

Els illots de ratolí s'han incubat durant 24 hores amb presència de: 3mM (G3); 5,5mM (G5); 11,1mM (G11); 16,7mM (G16); 24,4mM (G24) de glucosa; G3+1mM gliceraldehid (GL); G24+21,4mM manoheptulosa (MH) i G3+21,4mM 6-desoxiglucosa (6DG). Després de l'extracció del RNA i la síntesi del cDNA es van quantificar els diferents transcrits mitjançant la PCR a temps real. Els resultats han estat normalitzats respecte el mRNA del 18S expressat a cada mostra i relativitzats al valor obtingut als illots cultivats a 3mM de glucosa, als quals se'ls ha assignat el valor de 100%. Els valors estan expressats com la mitja \pm SEM de sis pàncreas en duplicat. Les significancies estadístiques s'han calculat a partir del test no-paramètric de Wilcoxon i s'indiquen: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$ en relació al cultiu de G3.

2.1.2.- EFECTE D'UN INHIBIDOR DE LA SÍNTESI PROTEICA (Ciclohexamida)

mRNA D'IDS

Per tal d'identificar el mecanisme d'acció de la glucosa en la regulació del gen de l'IDS i més concretament, examinar la importància de la síntesi proteica *de novo* en aquesta regulació, s'han cultivat els illots amb una concentració elevada de glucosa (24,4 mM) i ciclohexamida, un inhibidor de la síntesi proteica, a una concentració final de 20 µg/ml (264).

S'observa a la Figura 2.4 que la inhibició de la síntesi proteica redueix en un 208 % l'efecte estimulador de la glucosa (71 ± 9 % del valor control dels illots tractats amb ciclohexamida comparat amb 279 ± 54 % del control als illots cultivats sense l'inhibidor a alta concentració de glucosa, $p < 0,05$).

Fins i tot es pot observar una reducció del 29 % al comparar els illots tractats amb ciclohexamida amb els illots control, cultivats a baixa glucosa (3 mM).

mRNA D'AMILINA

En els mateixos illots, com a control positiu s'ha quantificat l'expressió del gen de l'amilina. S'observa a la Figura 2.4, també en aquest cas, quan els illots s'han cultivat amb ciclohexamida (20 µg/µl) a una concentració de glucosa de 24,4 mM, l'increment dels transcrits d'amilina produït a alta concentració de glucosa disminueix un 189 %.

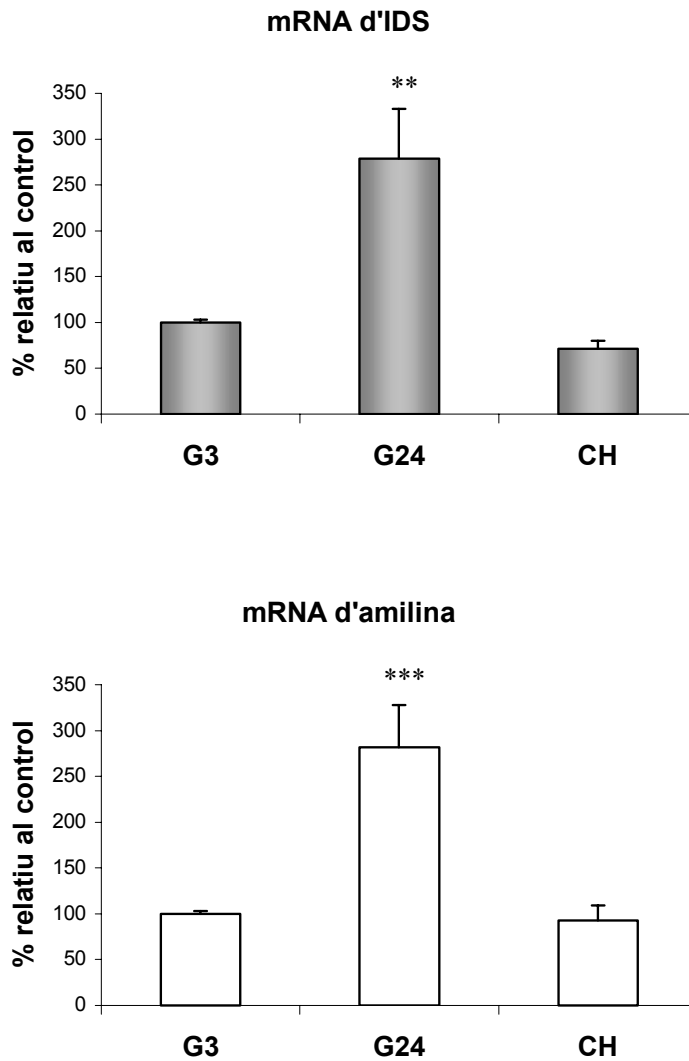


Figura 2.4. Efecte d'un inhibidor de la síntesi proteica sobre els mRNA d'IDS i amilina als illots de ratolí.

Els illots de ratolí s'han cultivat durant 24 hores a glucosa 3mM (G3); glucosa 24,4mM (G24) i G24 + ciclohexamida 20µg/ml (CH). La quantificació de l'expressió d'aquests gens s'ha dut a terme mitjançant PCR a temps real. Els resultats s'han expressat normalitzats amb el mRNA 18S i relatius al valor dels illots control (100% a 3mM glucosa). Representen la mitja \pm SEM de 3 experiments independents. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$ en relació a G3.

2.1.3.- EFECTE DE LA GLUCOSA SOBRE L'ESTABILITAT DEL mRNA

(Actinomicina)

S'ha demostrat que la incubació d'illots en presència de concentracions elevades de glucosa provoca un augment generalitzat de la transcripció i de la vida mitja del RNA total i del RNA poliadenilat dels illots (265,266).

A fi de determinar si l'efecte produït per la glucosa sobre el mRNA de l'IDS és degut a l'estimulació transcripcional del gen de l'IDS o bé, és el reflex d'una estabilització del seu missatger, s'han cultivat els illots a baixa (3 mM) i alta (24,4 mM) concentració de glucosa en presència d'un inhibidor de la transcripció gènica, l'actinomicina D a una concentració final de 5 µg/ml.

Per aquest experiment, el protocol que s'ha seguit no és el mateix que en els anteriors. Després del procés d'isolament els illots es deixen cultivar durant 24 hores en presència de glucosa (11,1 mM). Passat aquest període de precultiu, s'aparta una mostra d'illots i es congela (t_0), mentre que els altres illots es divideixen en dos grups que es segueixen mantenint en cultiu, un grup es cultiva amb glucosa 3mM i actinomicina D 5 µg/ml i l'altre a 24,4 mM de glucosa i actinomicina D 5 µg/ml. Se n'agafa una mostra de cada grup després de 12 hores (t_{12}) i al cap de 24 hores (t_{24}) per a determinar l'expressió dels diferents gens.

mRNA D'IDS

Com es mostra a la Figura 2.5, l'estabilitat del mRNA d'IDS es comporta igual a baixa (3 mM) com a alta (24,4 mM) concentració de glucosa. S'observa que durant les 12 primeres hores de cultiu amb actinomicina D (5 µg/ml), els nivells de mRNA d'IDS disminueixen un 70,6% a 3 mM de glucosa i un 75,7% a 24,4 mM de glucosa respecte al 100% corresponent al temps inicial. No obstant això, durant les

següents 12 hores, no es produeixen canvis en les dues condicions esmentades, es pot observar com el contingut de mRNA d'IDS es manté pràcticament constant.

El fet que es produeixi aquesta degradació del mRNA de l'IDS tan accelerada indica que la vida mitja dels transcrits d'IDS és d'aproximadament 12 hores. La inhibició de la transcripció gènica provoca un bloqueig total de la inducció per la glucosa del mRNA d'IDS.

mRNA D'AMILINA

Quan els illots es cultiven amb actinomicina D (5 µg/ml) a baixa concentració de glucosa (3 mM) el contingut de mRNA d'amilina es manté pràcticament constant ($102,3 \pm 40,3\%$ i $91,35 \pm 33,2\%$ a les 12h i 24h respectivament en relació al 100% en temps inicial), en canvi, quan els illots es cultiven amb actinomicina D a alta concentració de glucosa (24,4 mM), passades les 12 primeres hores hi ha un petit increment del mRNA d'amilina del 20,6%. Durant les següents 12 hores el contingut de mRNA d'amilina disminueix un 19,8%, mostrant una tendència a la reducció de l'estabilitat dels transcrits, però, en un període superior a les 24 hores.

En aquest cas no s'observa que la glucosa provoqui cap efecte estabilitzador sobre el contingut del mRNA d'amilina.

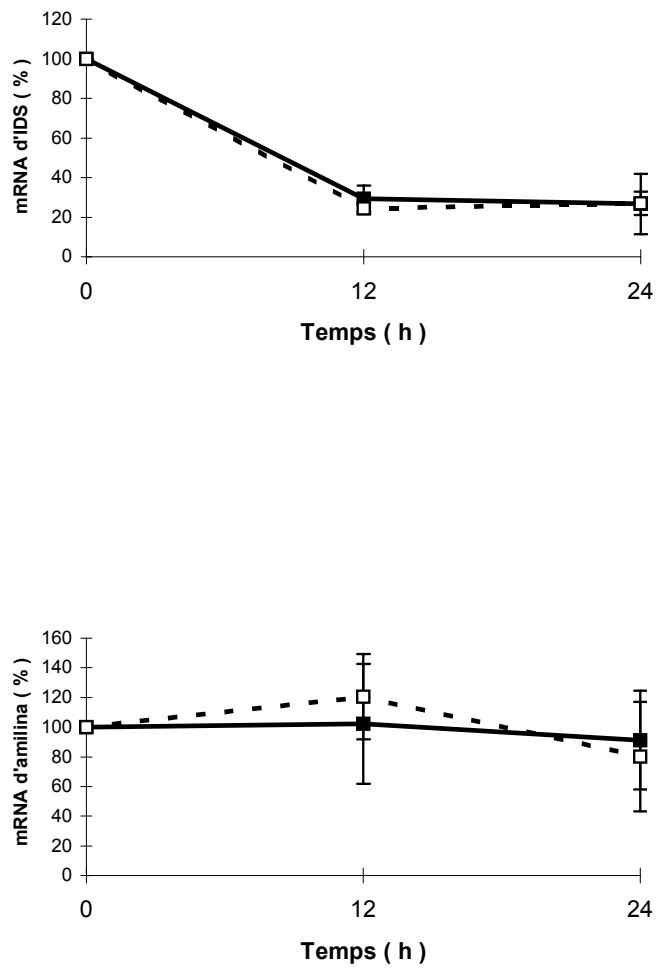


Figura 2.5. Efecte de la glucosa sobre l'estabilitat del mRNA d'IDS i d'amilina als illots pancreàtics de ratolí.

Els illots de ratolí s'han cultivat a glucosa 3 mM (línia contínua) o glucosa 24,4 mM (línia discontinua) durant un període màxim de 24 hores en presència d'actinomicina D a 5 µg/ml. Les quantitats relatives d'mRNA d'IDS i amilina s'expressen com a percentatge del valor obtingut al temps 0 (100%) i representen la mitja ± SEM de tres experiments independents.

2.2.- REGULACIÓ DEL CONTINGUT DE mRNA D'IDS, AMILINA I PERLECAN ALS ILLOTS PANCREÀTICS HUMANS

Un cop determinat el comportament de l'IDS als illots de ratolí vàrem voler estudiar el comportament d'aquest gen als illots pancreàtics humans. El protocol que es va seguir es pràcticament idèntic que en el cas anterior. Els *primers* i sonda que s'han dissenyat per l'amplificació de l'IDS, amilina i perlecan són específics per la seqüència d'aquests gens a l'espècie humana (mostrats a Materials i Mètodes II).

2.2.1.- EFECTE DE LA GLUCOSA I PAPER DEL METABOLISME GLICOLÍTIC

mRNA D'IDS

A la Figura 2.6 es mostra l'expressió de l'IDS als illots humans cultivats a concentracions creixents de glucosa durant 24 hores. Es pot observar com en aquest cas, la glucosa no produeix cap canvi significatiu sobre el contingut de mRNA d'IDS. Les variacions dels continguts de mRNA d'IDS a les diferents concentracions de glucosa respecte als illots control (100% a 3 mM de glucosa) són: 4.8% a 5,5 mM; 16,5% a 11,1 mM; 3,6% a 16,7 mM i 15% a 24,4 mM de glucosa.

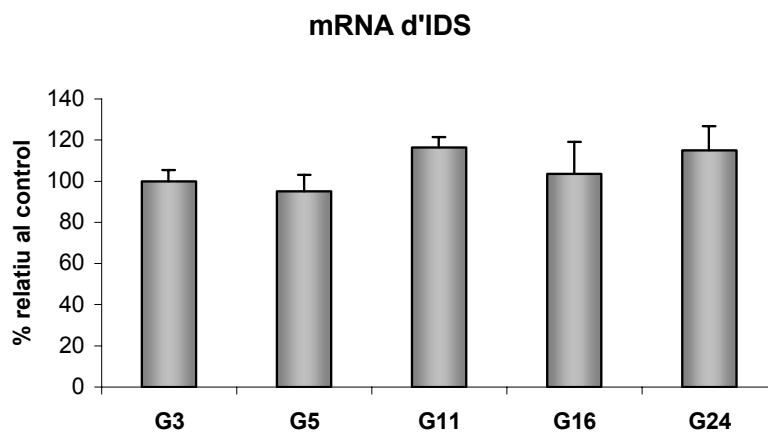
mRNA D'AMILINA

Els mateixos illots que han estat cultivats a diferents concentracions de glucosa, varen ser analitzats per a determinar l'expressió d'amilina (Figura 2.4). Com era d'esperar, el contingut de mRNA d'amilina augmenta significativament a 11,1 mM

de glucosa (174%), a 16,7 mM de glucosa (244%) i a 24,4 mM de glucosa (379%) en relació als illots cultivats a 3 mM de glucosa ($p < 0,05$).

mRNA DE PERLECAN

L'estudi de l'expressió del perlecan als illots humans cultivats a concentracions creixents de glucosa (Figura 2.4), indica que aquest gen no està regulat per la glucosa. Els increments obtinguts a les diferents concentracions de glucosa, respecte al valor dels illots control cultivats a 3 mM de glucosa han estat del 26,2% a 5,5 mM; 34,9% a 11.1 mM; 36% a 16,7 mM i 25,9% a 24,4 mM de glucosa.



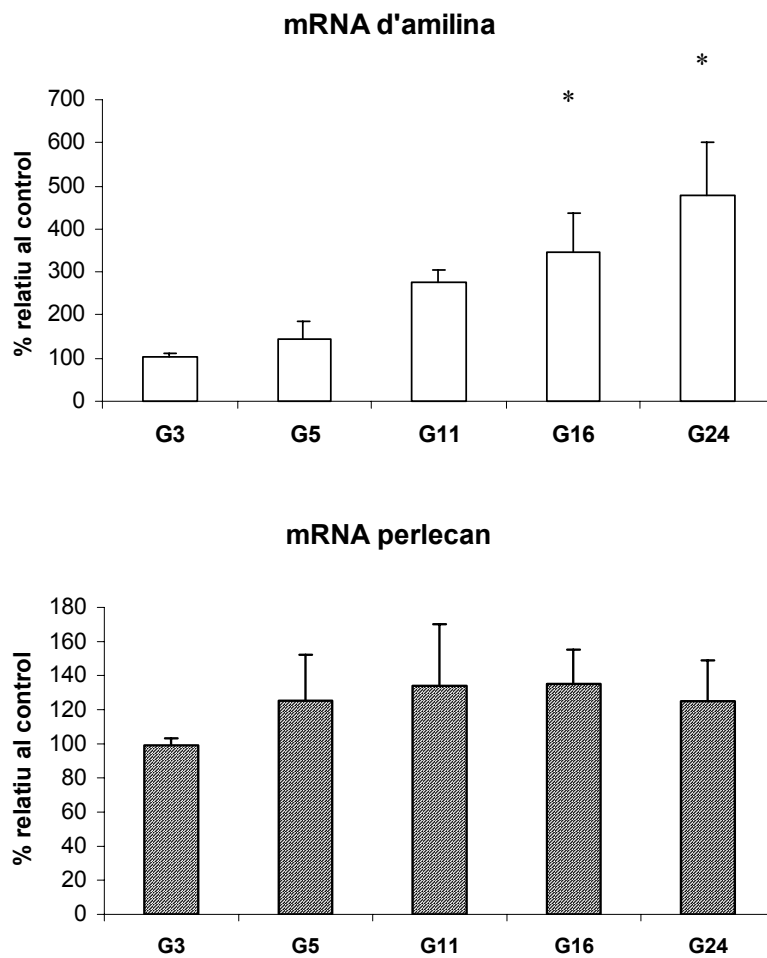


Figura 2.6. Efecte de la glucosa en la regulació dels mRNA d'IDS, amilina i perlecan als illots humans.

Els illots humans s'han precultivat en medi RPMI-1640 amb glucosa 11,1mM durant 24 hores; després s'han cultivat durant 24 hores més, en presència de 3 mM (G3); 5,5 mM (G5); 11,1 mM (G11); 16,7 mM (G16) i 24,4 mM (G24) de glucosa. Es representa la quantificació dels mRNAs obtinguda per PCR a temps real. Els valors han estat normalitzats respecte el mRNA de β -actina i s'expressen com a percentatge del valor obtingut als illots cultivats a glucosa 3 mM (100%). Representen la mitja \pm SEM de sis experiments independents. * $p \leq 0,05$ vers G3.

2.2.2.- EFECTE D'UN INHIBIDOR DE LA SÍNTESI PROTEICA (Ciclohexamida)

mRNA D'IDS

Els illots humans també han estat cultivats amb l'inhibidor de la síntesi proteica ciclohexamida (20 µg/ml) a una concentració elevada de glucosa (24,4 mM).

Com s'ha observat a l'apartat anterior (2.2.1), no existeixen diferències del contingut de mRNA d'IDS entre els illots cultivats a baixa (3 mM) i alta (24,4 mM) concentració de glucosa. Els illots que s'han mantingut durant 24 hores amb ciclohexamida contenen una quantitat de mRNA d'IDS similar a les altres dues condicions esmentades. Aquests resultats donen suport al fet que l'expressió de l'IDS no està regulada per glucosa als illots humans.

mRNA D'AMILINA

A la Figura 2.7 es pot observar com la ciclohexamida provoca un bloqueig total de l'increment de mRNA d'amilina induït per la glucosa. L'expressió d'amilina passa de $392,7 \pm 85,3\%$ a 24,4 mM de glucosa fins a $130 \pm 25\%$ quan en el medi s'hi afegix ciclohexamida, en relació al $100 \pm 6,5\%$ obtingut a glucosa baixa (3 mM).

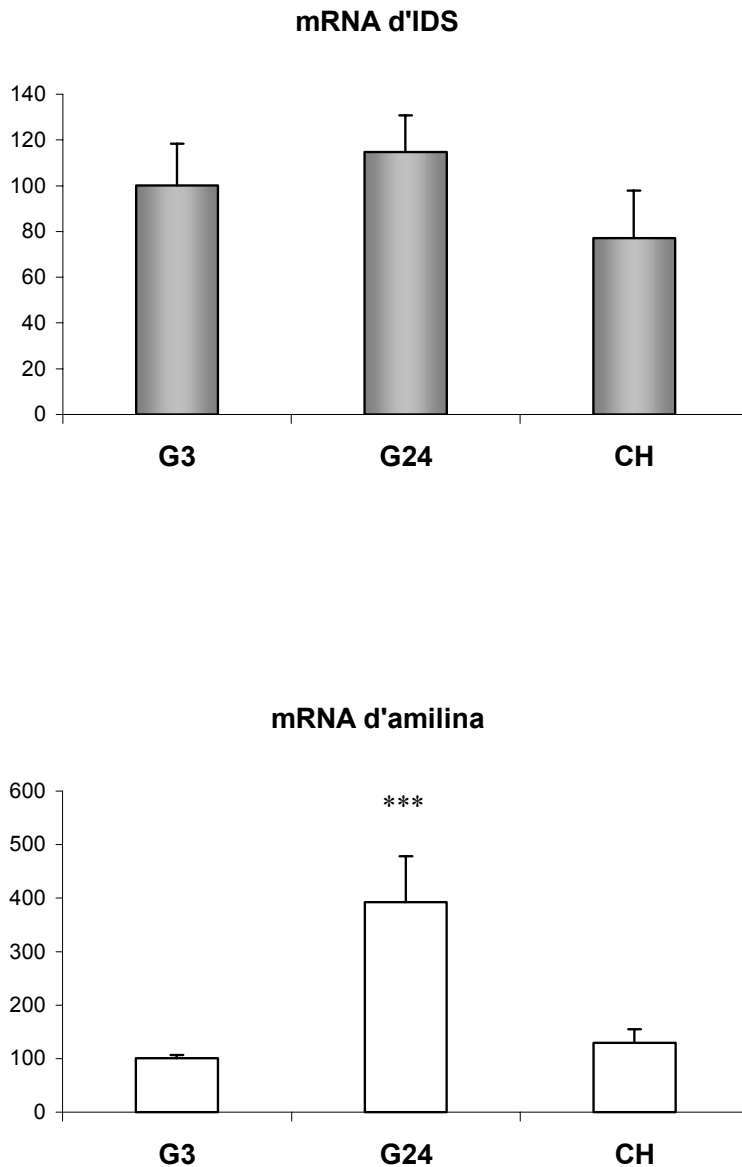


Figura 2.7. Efecte d'un inhibidor de la síntesi proteica sobre els mRNA d'IDS i amilina als illots pancreàtics humans.

Quantificació dels mRNA d'IDS i amilina d'illots humans cultivats durant 24 hores a 3 mM glucosa (G3); 24,4 mM glucosa (G24) o G24+ 20 μ g/ml ciclohexamida (CH) mitjançant PCR a temps real. Els resultats s'han expressat com la relació entre els nivells mRNA d'IDS o amilina i el mRNA de β actina expressat als illots. Els valors s'expressen com a percentatge del valor control (3 mM glucosa) i representen la mitja \pm SEM de 3 experiments independents.

2.2.3.- EFECTE DE LA GLUCOSA SOBRE L'ESTABILITAT DEL mRNA (Actinomicina)

Tot i no haver detectat diferències en l'expressió de l'IDS degut a la glucosa, es va analitzar l'estabilitat dels transcrits de l'IDS i de l'amilina d'illots humans cultivats amb actinomicina D (5 µg/ml) a 3 mM i 24,4 mM de glucosa, tant per estudiar la vida mitja dels transcrits com per determinar si la glucosa produïa un efecte estimulador sobre els missatgers d'aquests gens. El protocol experimental que s'ha seguit és el mateix descrit a l'apartat 2.1.3 per illots de ratolí.

A la Figura 2.8 es mostren les corbes d'actinomicina D per l'IDS i per l'amilina.

mRNA D'IDS

Es pot observar que quan els illots es cultiven amb actinomicina D (5 µg/ml) a 3 mM de glucosa, el mRNA d'IDS no mostra pràcticament cap variació respecte al 100% de contingut d'IDS a temps inicial. Es produeix una reducció del 8% i del 12% passades 12 i 24 hores respectivament. Curiosament, quan aquests illots es cultiven a 24,4 mM de glucosa s'observa una major degradació del missatger d'IDS en relació a 3 mM de glucosa. Així, la quantitat de mRNA d'IDS que queda després de 12 i 24 hores de l'addició d'actinomicina D és de $61\pm 7,6\%$ i $63\pm 5,9\%$ respectivament, del que hi havia al temps 0 (100%).

A diferència del comportament observat als illots de ratolí (Figura 2.5), la corba d'actinomicina D pels illots humans ens mostra que la vida mitja del missatger d'IDS és superior a 24 hores.

mRNA D'AMILINA

Un cop s'ha afegit actinomicina D al medi de cultiu es produeix una disminució del contingut de mRNA d'amilina, de manera que els illots cultivats a 3 mM de glucosa mantenen un $62,3 \pm 18,2\%$ i un $64,4 \pm 9,7\%$ del contingut de mRNA d'amilina a les 12 i 24 hores respectivament. El cultiu a alta concentració de glucosa (24mM) provoca una certa estabilitat del mRNA d'amilina durant les 12 primeres hores del seguiment, només es produeix una disminució del 20% respecte al valor a temps inicial (100%). Un cop transcorregut tot el temps de l'experiment (24 hores), la quantitat de mRNA d'amilina que queden en cultiu ($66,9 \pm 2,7\%$) son comparables amb els que es mantenen a 3 mM de glucosa ($64,4 \pm 9,7\%$).

En aquestes condicions no hi ha evidències d'un efecte estabilitzador de la glucosa sobre el mRNA d'amilina.

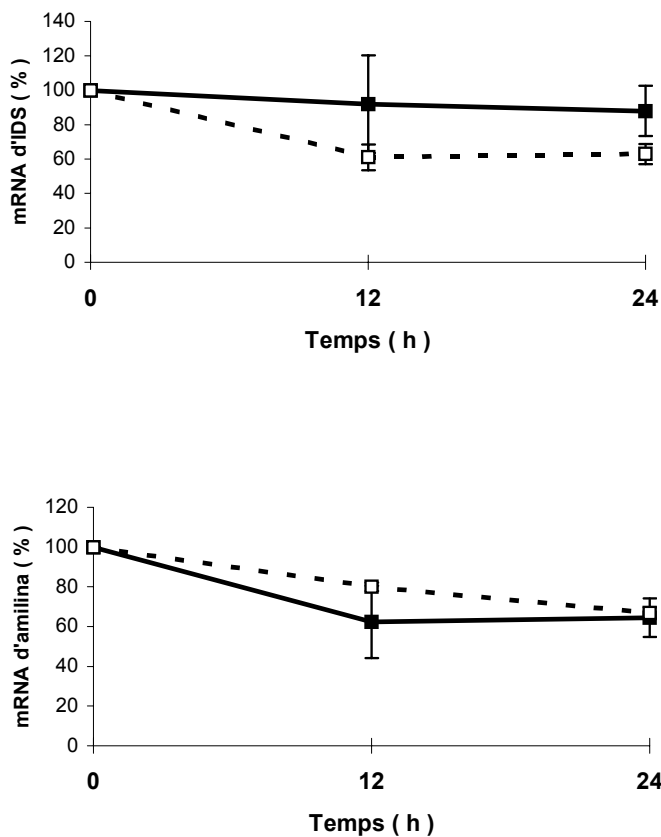


Figura 2.8. Efecte de la glucosa sobre l'estabilitat del mRNA d'IDS i amilina als illots humans.

Els illots humans s'han cultivat durant 24 hores a 11,1mM de glucosa. A continuació a temps 0 (t_0) s'ha canviat el medi de cultiu a: G3 + actinomicina D 5 µg/ml (línia contínua) o G24 + actinomicina D 5 µg/ml (línia discontinua) i s'han mantingut en aquestes condicions durant 12 hores (t_{12}) o 24 hores (t_{24}). Les quantitats relatives de mRNA d'IDS i amilina s'expressen com a percentatge del valor obtingut en el temps 0 (100%) i representen la mitja \pm SEM de tres experiments independents.

3.- DISCUSSIÓ II

La quantificació de l'expressió dels gens analitzats en aquest objectiu, s'ha determinat emprant com a eina metodològica la PCR a temps real o també anomenada PCR quantitativa. Degut a la baixa expressió de l'IDS present als illots pancreàtics i a la dificultat per quantificar aquesta baixa expressió mitjançant els mètodes clàssics, *Northern blot*, es va optar per aquesta tècnica molecular (PCR a temps real), la qual millora la sensibilitat de quantificació i és altament reproduïble, amb unes variacions inter- i intra- assaig molt baixes (267,268,269).

La quantificació del contingut de mRNA d'amilina als illots pancreàtics sotmesos a les diferents condicions experimentals, s'ha determinat a fi de validar el mètode de quantificació mitjançant la PCR a temps real, de gens presents als illots pancreàtics. S'ha comparat els resultats obtinguts amb aquesta metodologia amb els determinats anteriorment, mitjançant altres mètodes.

Els resultats obtinguts de la regulació de l'IDS als illots pancreàtics de ratolí, mostren que la glucosa provoca una estimulació de l'expressió del gen de l'IDS de forma dosi-depenent. Seguidament, s'ha analitzat la implicació del metabolisme de la glucosa en aquesta estimulació.

El bloqueig de la via glicolítica per la manoheptulosa inhibeix completament l'efecte estimulador de la glucosa sobre el mRNA d'IDS. A més, l'anàleg no metabolitzable, 6-desoxiglucosa és incapaç d'incrementar l'expressió de l'IDS. Aquestes observacions indiquen que la glucosa ha de ser metabolitzable via glucosa-6-fosfat perquè la senyal estimuladora sigui percebuda per la cèl·lula β .

Tot i que el metabolisme del gliceraldehid es consideri igual al de la glucosa a partir de les trioses fosfat en la via glicolítica, en els nostres resultats, no s'observa que sigui capaç de mimetitzar l'efecte produït per la glucosa, la qual cosa

indica que són necessàries les primeres reaccions de la via glicolítica per tal d'observar l'increment del mRNA d'IDS.

La inhibició de la síntesi proteica amb ciclohexamida bloqueja els efectes produïts per la glucosa sobre el mRNA d'IDS, indicant que l'acció estimuladora de la glucosa succeeix en presència de proteïnes sintetitzades *de novo*.

Les corbes de decaïment del mRNA a baixa (G3) i alta (G24) concentració de glucosa, i en presència de l'inhibidor transcripcional actinomicina D, mostren que l'efecte produït per la glucosa sobre el mRNA d'IDS no és degut a l'estabilització del missatger (272), sinó que actua a través d'un mecanisme transcripcional. La vida mitja del mRNA d'IDS és pràcticament la mateixa a alta i baixa concentració de glucosa, i correspon a unes 12 hores, passat aquest temps, només resta un 30% de mRNA d'IDS original, el qual es va degradant molt lentament.

Alguns estudis sobre l'activació de gens glicolítics i lipogènics hepàtics han suggerit el paper essencial que l'acumulació de glucosa-6-fosfat tindria en aquesta regulació, sense que fos necessària la seva metabolització posterior a la via glicolítica (273,274). S'ha postulat que aquest metabòlit actuaria sobre algun gen de resposta primari, el producte del qual afectaria als gens en qüestió. Alternativament, podria interferir d'alguna manera amb el metabolisme intracel·lular, tot generant altres metabòlits que serien els veritables activadors transcripcionals. Els nostres resultats suggereixen que la formació de glucosa-6-fosfat és necessària i de fet suficient per a l'estimulació del gen de l'IDS per la glucosa. Aquest fet explicaria perquè el gliceraldehid és incapaç de produir el mateix efecte que la glucosa tot i incorporar-se a la via glicolítica. La glucosa-6-fosfat seria la responsable de l'activació d'altres metabòlits generats *de novo*, necessaris per l'estimulació de l'expressió del IDS, com així ho demostren els resultats amb ciclohexamida.

El patró d'expressió de l'IDS als illots humans en relació a diferents concentracions de glucosa, no segueix el mateix comportament que l'observat anteriorment als illots de ratolí. En aquest cas, el contingut de mRNA d'IDS no està regulat pel metabolisme glicolític.

La inhibició de la síntesi proteica amb ciclohexamida no modifica l'expressió de l'IDS als illots humans, en relació a l'expressió obtinguda a les diferents concentracions de glucosa. Aquests resultats donen evidència de que els factors implicats en la regulació de l'IDS als illots humans no estan relacionats amb la via glicolítica. Les corbes d'actinomicina D mostren que, després de 24 hores de cultiu, a una concentració de glucosa baixa, 3 mM, el contingut de mRNA d'IDS es manté força estable, observant-se només un 10% de degradació del mRNA. En contra al que era d'esperar, s'observa que quan el cultiu amb actinomicina D s'ha mantingut a 24,4 mM de glucosa, el contingut de mRNA d'IDS disminueix ràpidament durant les primeres 12 hores, a partir d'aquest moment el mRNA d'IDS es manté sense degradar-se. En base a que la glucosa no afecta l'expressió d'IDS, esperaríem que la cinètica de degradació del mRNA d'IDS a alta i baixa concentració de glucosa seguís un patró d'expressió similar. Tot i així, cal destacar que a les 24 hores de cultiu, i probablement si s'hagués prolongat el període de cultiu, l'abundància de mRNA d'IDS a baixa i alta concentració de glucosa són molt similar. Tanmateix, al comparar aquesta corba d'actinomicina D, amb l'obtinguda als illots de ratolí, s'observa que la vida mitja del mRNA de l'IDS als illots humans és molt més llarga, més de 24 hores. Estudis previs on varen analitzar l'estabilitat del mRNA de l'IDS al cultiu de fibroblasts humans amb actinomicina D (10 µl/ml), observaren que els diferents transcrits de l'IDS tenien una vida mitja de fins a 72 hores (220).

La diferent regulació del gen de l'IDS en resposta al metabolisme glicolític entre els illots humans i els illots de ratolí podria ser deguda a la divergència entre les seqüències dels promotors dels respectius gens. Mentre que les seqüències del

gen codificant per la proteïna de l'IDS, tenen un 85% d'homologia (216), les seqüències del promotors tan sols conserven un 32% d'homologia. Per tant, és lògic pensar que la seqüència del promotor de l'IDS de ratolí conté una regió sensible a la regulació pel metabolisme glicolític, mentre que aquesta regió s'ha perdut a la seqüència humana.

Els resultats obtinguts de la regulació de l'IDS per la glucosa als illots humans, no permeten extreure cap conclusió sobre la implicació directa d'aquesta regulació en la formació dels dipòsits d'amiloid. És ben conegut però, que els dipòsits d'amiloid no es formen a totes les espècies, mentre que als illots humans es formen dipòsits d'amiloid, als illots de ratolí no es produeix l'amiloidogènesis. Aquest fenomen, podria estar relacionat amb el diferent patró d'expressió de l'IDS en resposta a la glucosa, obtingut entre els illots humans i els de ratolí.

Tant als illots humans com als illots de ratolí, l'amilina es regula de forma similar, incrementant la seva expressió en resposta a concentracions creixents de glucosa, en canvi l'IDS no. Podríem hipotetitzar que la falta d'expressió de l'IDS en resposta a la glucosa als illots humans, produeix que a alta concentració de glucosa no es degradi suficient perlecan, provocant d'aquesta manera, una acumulació de perlecan als illots pancreàtics. Al mateix temps, a alta concentració de glucosa, es produeix un augment d'expressió d'amilina, i com estudis previs han suggerit (45), una alteració del seu processament. Per tant, aquests dos fenòmens, donats a la mateixa concentració de glucosa, podrien afavorir a la interacció entre l'amilina i el perlecan, formant d'aquesta manera el nucli del dipòsit d'amiloid.

Com s'ha comentat anteriorment, la regulació del gen de l'amilina fou determinada principalment per verificar el mètode de quantificació utilitzat en aquest objectiu, la PCR a temps real. Els resultats obtinguts de l'expressió de l'amilina, tant als illots de ratolí com als illots humans, han estat comparats amb estudis previs

realitzats pel nostre grup, mitjançant la tècnica de *Northern blot*, als illots de rata (275), i als illots humans (280,45). En aquest treball s'han mantingut les mateixes condicions de cultiu, tant el temps com les concentracions de les substàncies afegides al cultiu, que els estudis esmentats.

Els nostres resultats indiquen que l'amilina està regulada per concentracions creixents de glucosa, tal i com s'havia determinat en treballs anteriors (276-278). La glucosa estimula l'expressió del mRNA d'amilina a través de la via glicolítica, com ho indica l'efecte bloquejant de la manoheptulosa i la 6-desoxiglucosa. En aquest cas, igual com s'havia observat en la regulació de l'IDS, el gliceraldehid no és capaç de produir la mateixa resposta estimuladora que produeix la glucosa.

L'estimulació produïda per la glucosa sobre el contingut de mRNA d'amilina queda totalment bloquejada per la inhibició de la síntesi proteica, amb ciclohexamida. La glucosa actuaria a través de la transcripció gènica i no mitjançant l'estabilització del missatger, com ho indica les corbes de decaïment del mRNA amb actinomicina D. Estudis previs mitjançant hibridació *in situ* quantitativa varen obtenir resultats similars (279).

Els resultats obtinguts de l'expressió del mRNA d'amilina en aquest estudi, coincideixen amb els determinats a partir de *Northern blot* (275,280,45), indicant que el mètode de la PCR a temps real utilitzat, és totalment vàlid per a la quantificació de gens en illots pancreàtics.

Tant als illots pancreàtics de ratolí com als illots humans, el contingut de mRNA del perlecan no varia en resposta a les concentracions creixents de glucosa. Aquests resultats estan en contradicció amb estudis previs on s'havia detectat una disminució de l'expressió del mRNA del perlecan en resposta al cultiu amb glucosa, a cèl·lules epitelials de glomèrul (167,168), cèl·lules messangials de rata (169) i cèl·lules d'adiposits de ratolí (170). L'anàlisi de l'expressió del perlecan a diferents

models animals diabètics, ha donat com a resultat una disminució de la síntesi de heparan sulfat al fetge (163-165).

No obstant, de tots aquests treballs no n'hi ha cap que s'hagi realitzat als illots pancreàtics, com s'ha estudiat en aquesta part del treball. Per tant, aquesta contradicció que s'observa entre els nostres resultats i els estudis previs esmentats, podria estar atribuïda a diferències en el tipus cel·lular estudiat.

D'altra banda, és ben conegut que per a la formació dels dipòsits d'amiloid associats amb la diabetis tipus 2 a l'illot pancreàtic, es produeix una acumulació de perlecan (84). Aquest fet estaria en contraposició amb la disminució de la síntesi del perlecan a la diabetis, detectada per diversos autors (163-165) i amb els nostres resultats, els quals indiquen, que la glucosa no provoca cap canvi en l'expressió del mRNA del perlecan. Per tant podríem suggerir que els canvis produïts al perlecan als illots pancreàtics a la diabetis tipus 2, són a nivell post-transcripcionals.

OBJECTIU III:

**ESTUDI DE LA FUNCIO DE L'IDURONAT-2-
SULFATASA A L'ILLOT PANCREÀTIC.**

Aquesta part del treball s'ha centrat en analitzar la implicació de l'iduronat-2-sulfatasa sobre el mecanisme funcional de l'illot pancreàtic, concretament a la cèl·lula β de l'illot. S'ha estudiat l'efecte, tant de la sobreexpressió com del bloqueig de l'expressió del gen de l'IDS, en la funció secretora de l'illot pancreàtic.

Per tal d'aconseguir un augment de l'expressió de l'IDS, s'ha emprat la infecció amb els lentivirus contenint el IDS sense, i per obtenir una disminució de l'expressió de l'enzim, s'han infectat els illots amb els lentivirus IDS antisense.

Objectius específics

- Estudiar l'eficiència d'expressió de l'iduronat-2-sulfatasa, dels illots infectats amb els vectors lentivirals, en relació amb els illots no infectats.
- Estudiar l'eficiència del constructe antisense pel que fa al bloqueig de l'expressió de l'IDS als illots infectats.
- Investigar l'efecte que produeix l'IDS sobre la funció secretora d'insulina dels illots pancreàtics. Analitzar el contingut d'insulina dels illots i la seva secreció al medi.
- Investigar l'efecte de l'IDS a l'estructura morfològica dels illots pancreàtics humans.

Disseny experimental

1. Formació dels tres lentivirus utilitzats per assolir aquest objectiu: lentivirus-EGFP; lentivirus-IDS sense i lentivirus-IDS antisense.
2. Comprovació de l'expressió dels lentivirus als illots pancreàtics de ratolí i als illots humans.
3. Anàlisi de la secreció i el contingut d'insulina dels illots de ratolí infectats amb els lentivirus.
4. Observació per microscopi electrònic de la morfologia dels illots humans infectats amb els lentivirus.

1. MATERIALS I MÈTODES III

1.1.- CONSTRUCTES LENTIVIRALS

Els mètodes més utilitzats per a la transferència gènica (281), són:

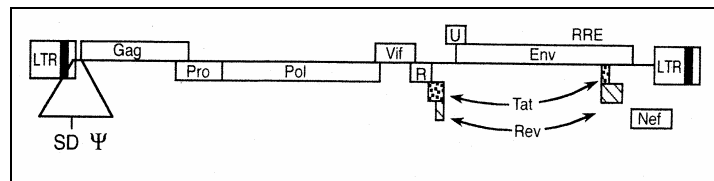
- **Vectors Adenovirals:** Permeten una alta eficiència d'entrada del transgen en la majoria de teixits *in vivo*, però la seva expressió és transitòria. Això és degut principalment, a la resposta immune en contra les cèl·lules infectades, les quals expressen baixos nivells de proteïnes virals.
- **Retrovirus (*MLV Moloney leukemia virus*):** S'integren al genoma de la cèl·lula diana, sense transferir cap gen viral. Però només es poden transduir en cèl·lules en divisió, per tant, aquest fet limita el seu ús a cèl·lules no proliferatives com: hepatocits, neurones, cèl·lules mare hemapoiètiques o cèl·lules beta dels illots de Langerhans.
- **Lentivirus (*HIV*):** Aquest sistema de transfecció gènica basat amb el virus HIV, permet transduir en cèl·lules que no es divideixen, mantenint l'expressió del transgen durant mesos. El fet de portar l'envoltori del virus de l'estomatitis vesicular (VSV) li permet infectar un gran rang de teixits. Degut a aquestes característiques, en aquest treball s'ha utilitzat aquest sistema de transducció.

1.1.1.- CARACTERÍSTIQUES DELS VECTORS LENTIVIRALS

La construcció dels virus lentivirals es basa en el virus HIV (virus humà de la immunodeficiència). L'estructura genòmica d'aquest lentivirus és molt similar a la

dels retrovirus. Codifica pels gens **gag**, **pol** i **env**. Les proteïnes d'aquests gens són úniques per cada tipus de retrovirus.

- Gen **gag** : codifica per les proteïnes virals del nucli (proteïnes de la matriu, de la càpside i la nucleocàpside).
- Gen **pol** : codifica els enzims virals per la replicació.
- Gen **env** : codifica per l'envoltori glicoproteic del virus.



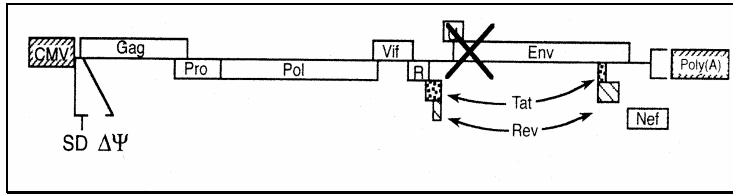
Els lentivirus per a la infecció es generen mitjançant els plàsmids següents (282):

pCMVΔR9 : vector d'empaquetament

Conté els gens **gag** i **pol**, que codifiquen per les proteïnes responsables de l'empaquetament i pels enzims de la replicació. Conté el promotor del citomegalovirus (CMV) seguit de les proteïnes virals en trans.

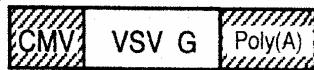
La modificació d'aquest DNA implica l'eliminació de les seqüències en cis crucials per l'empaquetament, transcripció reversa i la integració dels transcrits derivats del plàsmid d'empaquetament.

Concretament, en aquest treball s'ha usat el vector pCMVΔR8.7, que és una modificació de l'anterior, on s'ha reduït el potencial de recombinació i s'han eliminat alguns dels efectes citotòxics de les proteïnes virals.



pMDG : vector codificador de la càpside del virus

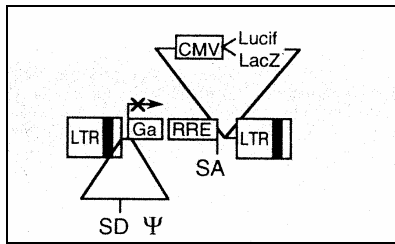
Conté el gen **env**. Codifica la glicoproteïna G del virus de l'estomatitis vesicular (VSV-G). Incrementa l'estabilitat, permetent la concentració de partícules per ultracentrifugació. Elimina el tropisme de l'anterior vector, ampliant el tipus de teixits i tipus cel·lulars on es pot transduir.



pHR'-CMV LacZ: vector de traducció

Conté el gen d'interès sota el promotor del CMV i els elements del HIV en cis, necessaris per l'empaquetament, transcripció reversa i la integració, així com un únic lloc de clonatge per el cDNA heteròleg. Aquest disseny permet:

- a) Augmentar l'eficiència d'empaquetament.
- b) Que l'eficiència de transcripció i l'exportació citoplasmàtica de tot el vector sigui només en presència de proteïnes reguladores Tat i Rev del HIV, codificades per pCMV Δ R9.



1.1.2.- SUBCLONATGE DE L'IDS AL VECTOR pHR-CMV

Per assolir l'objectiu final i aconseguir una augment i un bloqueig de l'expressió de l'IDS, calia subclonar tant l'IDS en sentit correcte (IDS sense) com l'IDS en sentit invers (IDS antisense), de manera que el transcrit format s'hibrida al mRNA de l'IDS endogen bloquejant la seva expressió. Per aquesta construcció s'han seguit els mateixos passos descrits anteriorment en l'apartat 1.7 de Materials i mètodes I.

1. Disseny dels oligonucleòtids:

IDS 5' sense

5'-AATCGACGCGTGAAATGCCGCCACC-3'
MluI

IDS 3' sense

5'-ACCGCTCGAGTCAACAACACTGG-3'
XhoI

IDS 5' antisense

5'-TCGACGCGTGCATCAACAACACTGG-3'
MluI

IDS 3' antisense

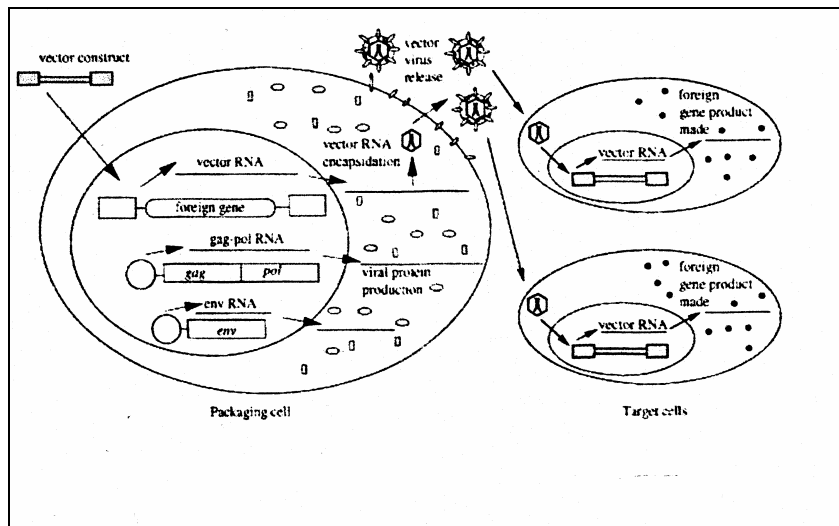
5'-ACCGCTCGAGGAAATGCCGCCACC-3'
XhoI

2. PCR de l'IDS sense i antisense. Purificació dels fragments amplificats.

3. Digestió dels fragments amplificats i del vector pHR-CMV-LacZ amb les endonucleases de restricció MluI/XhoI. Aquesta digestió provoca l'alliberament del gen LacZ del vector.
4. Formació dels recombinants amb l'enzim lligasa (lligació).

1.1.3.- PRODUCCIÓ DE VECTORS LENTIVIRALS

En aquest punt s'aconsegueix mitjançant la transfecció dels tres vectors descrits anteriorment, la formació del lentivirus amb el gen d'interès. Com es representa en la següent figura (283).



❖ Reactius

- Medi de cultiu per les cèl·lules 293T (veure secció material i mètodes I)
- Solucions per a la prova de precipitats
- CaCl_2 2,5M
- Heps 2x

Hepes	10 g
NaCl	16 g
H_2O fins a	1l

Ajustar el pH a 7,05 - 7,10 amb NaOH

- Tampó fosfar salí (PBS)
- Tampó fosfat (Na_2HPO_4) x100
 - Na_2HPO_4 70 mM
 - $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 70 mM
- Mesclar les dues solucions fins arribar a pH 6,8
- Cloroquina
- Butirat sòdic
- Plasmids pCMV Δ R8.7, pMDG i pHR'-CMV LacZ (cedit per B. Thorens, Universitat de Lausanne) (284).

❖ Equipament i material

- Plaques de 24 pous
- Plaques de 10 cm de diàmetre
- Incubador de cultius
- Tubs cònics de 12 ml
- Filtres de 0,45 μm

❖ Procediment

1. Es tripsinitzen les cèl·lules 293T (línia cel·lular humana de ronyó, altament transfectable) (250) i es traspassen de 2 a $2,5 \times 10^6$ cèl·lules en plaques de 10 cm de diàmetre amb 5 ml de medi de cultiu.
2. Si el plasmid amb el cDNA d'interès és una nova preparació de maxi-prep, cal fer primer la prova de tamany de precipitats amb la tècnica de CaCl_2 , per saber la concentració de fosfat sòdic que s'ha d'usar per a la transfecció. Aquesta prova consisteix en mesclar les següents solucions en els pouets d'un aplaca de 24 pous:

A: Barreja de plasmids	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
B: Hepes + 100x NaPO ₄	8 µl	10 µl	12 µl	14 µl	16 µl	18 µl
Medi	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Es mescla A amb B i es deixa 1 min perquè es formin els precipitats. Seguidament es barreja amb 1 ml de medi per aturar el procés de formació. S'incuba durant 30 min en l'incubador de cultiu perquè es vagin dipositant els precipitats. S'observa la mida dels precipitats i s'escull la concentració de fofat sòdic que hagi format uns precipitats petits i rodons, tipus bacteri de coc. Generalment es troba entre 10 i 12 µl.

- Es canvia el medi de les cèl·lules i s'afegeix 10 ml de medi complet amb 25 µM de Cloroquina.
- Transfectar amb els tres vectors plasmídics. Cal que totes les solucions estiguin a temperatura ambient i la concentració dels plasmids sigui de 1 µg/µl. Es preparen dos tubs còncics i en cadascun s'afegeixen les següents solucions, seguint el mateix ordre (volums corresponents a 1 placa):

	<u>Tub A</u>		<u>Tub B</u>
H ₂ O	425 µl	2x Hepes	490 µl
pCMVΔR8.7	7,5 µl	100x NaPO ₄	10 µl
pMD-G	2,5 µl		
pHR'-CMV-X	10 µl		
CaCl ₂	50 µl		

- Es mescla 0,5 ml de B amb 0,5 ml de A i es deixa reposar 1 min. S'afegeix la barreja en la placa que prèviament hem canviat el medi. Es deixa incubar durant 16 h com a màxim a l'incubador de cultiu a 37°C.

6. Passat aquest temps, es treuen els precipitats formats i s'afegeix 10 ml de medi complet amb un contingut de 10 mM butirat sòdic, per afavorir l'activació dels promotors.
7. Al dia següent, es recull el medi (és on es troben els lentivirus) i es fan alíquotes. Centrifugar a 1000 g durant 5 min a temperatura ambient. Filtrar el sobrenadant amb filtres de 0,45 µm. S'alíquota i es guarda a -80°C fins el moment de ser utilitzats.

1.1.4.- TITULACIÓ DEL LENTIVIRUS

Un cop s'han generat els lentivirus, cal titular-los per tal de saber a quina concentració estan.

❖ Reactius

- INNOTEST™ HIV Antigen mAb (Innogenetics, Belgica). Conté:
 - Tires de 8 pous que contenen l'anticòs humà anti-HIV
 - Control negatiu
 - Solució del conjugat 1 (es prepara al moment)
 - Concentrat del conjugat 1 (C1) 50 µl
 - Diluint del conjugat 1 (CD1) 950 µl
 - Solució NP 40 (NP) 1 ml
 - Solució del conjugat 2 (es prepara al moment)
 - Concentrat del conjugat 2 (C2) 40 µl
 - Diluint del conjugat 2 (CD2) 4 ml
 - Solució de rentat (es prepara al moment, diluint amb H₂O)
 - Solució substrat (es prepara al moment)
 - Tampó substrat (SB) 4 ml
 - Solució del cromogen TMB (S) 40 µl
 - Mostres estàndard

❖ Equipament i material

- Agitador
- Estufa a 37°C

❖ Procediment

Es segueix el protocol subministrat per la casa comercial. Cal que tots els reactius estiguin a temperatura ambient.

1. Es reparteixen 100 µl de la solució del conjugat 1 i 100 µl de mostra, controls o corba estàndard en cada pou.
2. Es barreja la placa en un agitador durant 1 min (tapat amb un adhesiu) i seguidament s'incuba durant 60 min a 37°C.
3. Es fan tres rentats, afegint 300 µl de solució de rentat en cadascun.
4. S'afegeixen 200 µl de solució del conjugat 2 a cada pou. Es tapa i es torna a incubar durant 30 min a 37°C.
5. Es tornen a fer els mateixos rentats que en el pas 3. i s'afegeixen 200 µl de solució substrat a cada pou. Es deixa incubant 30 min a temperatura ambient.
6. S'afegeix a la solució anterior 50 µl d'àcid sulfúric (1-2 mol/l), es tapen els pous i es barregen.
7. Es llegeix l'absorbància a la longitud d'ona de 450 nm.
8. Es fa l'extrapolació del resultat obtingut a la mostra problema en la corba estàndard.

1.2.- INFECCIÓ LENTIVIRAL

A cada experiment a part d'infectar amb els lentivirus que contenen els gens d'interès, en aquest cas l'IDS sense i l'IDS antisense, es reserven dos grups d'illots més. Un d'ells s'utilitza com a control, i tot i estar manipulat igual que els altres, no s'infecta amb cap lentivirus. Com a control positiu, per controlar que la infecció s'ha produït correctament, s'infecten els illots amb un lentivirus que conté el gen de la proteïna verda (EGFP: *enhancer green fluorescent protein*).

❖ Reactius

- Solució de disgregació (EH Ca⁺² Fre EGTA)

NaCl	725 mg
KCl	40 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	20 mg
NaH ₂ PO ₄	12 mg
NaHCO ₃	120 mg
Hepes	235 mg
EGTA 1 mmol/l	38 ml
H ₂ O destil·lada fins a	100 ml
- Lentivirus del IDS sense i antisense
- Lentivirus EGFP (cedit per B. Thorens, Universitat de Lausanne)
- Medi de cultiu per illots
- Microscopi de fluorescència

❖ Equipament i material

- Material estèril
- Campana de flux laminar de bioseguretat
- Bany tèrmic
- Incubador de cultiu
- Tots els aparells i el laboratori on s'ha treballat amb els virus, són d'ús exclusiu per aquesta finalitat.

❖ Procediment

1. Cultiu dels illots

- a) Després d'extreure els illots pancreàtics, es cultiven amb 10 ml de medi de cultiu per illots RPMI-1640 a una concentració de glucosa de 11,1 mM, durant 18 h a 37°C amb una atmosfera humificada d'aire: CO₂ (95% : 5%).
- b) Passat aquest temps, els illots es cultiven amb les condicions de dissenyades per cada experiment.

2. Disgregació dels illots humans

La disgregació dels illots, augmenta l'eficiència d'infecció, permetent que els lentivirus penetrin a cèl·lules de l'interior de l'illot, sense afectar la funcionalitat del mateix. (Aquest pas es pot suprimir als illots de ratolí)

- a) Es traspassen els illots de la placa de cultiu a un tub eppendorf estèril i es centrifuga a 800 g durant 10 min.
- b) S'aspira el medi i s'afegeix 400 µl de solució de disgregació. S'incuba durant 5 min a un bany a 30°C.
- c) La reacció s'atura centrifugant a 800 g durant 2 min a 4°C i espirant el sobrenadant.

3. Infecció lentiviral

- a) S'afegeix la quantitat de virus necessària a cada eppendorf, seguint els càlculs:

$$\text{Número d'illots} \times \frac{296 \text{ cèl·lules}}{1 \text{ illot}} \times \frac{20 \text{ Unitat d'infecció}}{1 \text{ cèl·lula}} \times \frac{1 \text{ ml}}{\text{Unitat d'infecció}}^1$$

¹ Depenent de la titulació del virus

- b) Es traspassen els illots amb els virus a les seves plaques corresponents.

- c) Es deixen a l'incubador de cultiu durant 4 hores. Passat aquest temps s'afegeix el medi de cultiu corresponent.
- d) A les 24 hores es torna a canviar el medi, afegint de nou.
- e) Al cap de 48h, després de la infecció, els illots ja es poden tractar pel seu estudi posterior (fixació per microscopia electrònica o estudis de secreció).
- f) En aquest punt, s'observa sota microscopi de fluorescència, l'expressió de la proteïna verda als illots infectats amb el lentivirus-EGFP.

1.3.- DETECCIÓ PER WESTERN BLOT

Aquesta tècnica permet la detecció d'una proteïna en concret en una mostra, i al mateix temps, la seva quantificació mitjançant sistemes densitòmics.

El gel de poliacrilamida, per on es fan passar les mostres, es prepara de manera que el porus que forma, sigui d'una mida comparable al de les proteïnes. D'aquesta forma, la separació electroforètica depèn de la densitat de càrrega de les molècules i del seu pes molecular.

1.3.1.- QUANTIFICACIÓ DE PROTEINES. MÈTODE DE BRADFORD.

Per poder carregar la mateixa quantitat de proteïna total en cada mostra, cal prèviament haver mesurat la concentració de proteïnes presents en cada mostra.

❖ Reactius

- Bio-Rad Protein Assay
- Albumina (BSA)

❖ Equipament i material

- Cubetes per electroforesi

- Espectrofotometre

❖ Procediment

1. Es crea una recta patró a partir d'una concentració coneguda d'albúmina (BSA).
2. A totes les mostres (problema, patró i control) s'afegeixi el mateix volum del colorant "*Bio-Rad protein assay*", que s'uneix específicament a les proteïnes.
3. Es fa la lectura d'absorbància a una longitud d'ona de 595 nm.
4. Les mesures d'absorbància obtingudes en les mostres problemes s'extrapolen en la recta patró per conèixer la concentració.

1.3.2.- TRANSFERÈNCIA DE LES PROTEÏNES A MEMBRANA DE NITOCEL·LULOSA

❖ Reactius

- Tampó fosfat salí (PBS)
- Marcador de pes molecular
- Tampó de mostra desnaturalitzant 2x

Tris 1M pH 6,8	2,5 ml
EDTA 250mM pH 6,8	2 ml
SDS 20%	2 ml
sucrosa	1,2 g
H ₂ O destilada fins a	10 ml

Pols de blau de bromofenol

En el moment de preparar les mostres s'afegeix DTT a una concentració final de 65 mM
- Tampó de transferència

Tris	0,6 g
Glicina	2,88 g
Metanol	40 ml
H ₂ O destil·lada fins a	200 ml
- Tampó d'electroforesi 10x

Tris	15 g
Glicina	72 g
H ₂ O destil·lada fins a	500 ml

Per correr el gel: es dilueix el tampó d'electroforesi a 1x amb H₂O destilada i s'afegeix 5 ml de sodiumdodecilsulfat (SDS) 20% per cada litre preparat.

- Tampó d'homogenització de les mostres (TDLB)

Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
SDS	0,1%
Azida	0,02%
Igepal	1%
Deoxicolat sodic	0,5%

- Gel de poliacrilamida-SDS al 10%

	Gel de concentració	Gel de resolució (10%)
Acrilamida 40%	1,25 ml	2,50 ml
Bis-acrilamida 1%	1.30 ml	1,30 ml
Tris-HCl 3M pH 8,7	-----	1.25 ml
Tris-HCl 1M pH 6,8	1,35 ml	-----
SDS 20%	100 µl	100 µl
H ₂ O destilada	4,70 ml	6 ml
APES 10%	135 µl	135 µl
TEMED	13,5 µl	13,5 µl

- Concentració d'inhibidors de proteases

PMSF	2mM
Aprotinina	1 µg/µl
EDTA	1 mM
Pepstatina A	2 µM
TPCK	100 µg/ml
E 64	10 µM

- Ponceau 0,2% en àcid tricloroacètic 3%

❖ Equipament i material

- Kit de Mini-protean
- Plaques de vidre, separadors i pintres
- Cubeta d'electroforesi
- Membrana de nitrocel·lulosa de 0,45 µm
- Paper de filtre Whatman tallat a la mida del gel
- Sonicador

- Xeringa (Hamilton)
- Font elèctric
- Aparell de transferència semi-sec (Trans-blot)

❖ Procediment

1. Preparació de les mostres

- Després d'extreure el medi de cultiu, cal rentar varies vegades les mostres amb tampó fosfat salí (PBS), per eliminar el fetal present en el medi de cultiu.
- La mostra es recull amb tampó TDLB i inhibidors de proteases
- S'homogenitzen les mostres mitjançant ultrasons durant 15 segons a 25 wats.
- En aquest punt, es quantifiquen les proteïnes (mètode de Bradford 1.3.1)
- Es congelen les mostres a -20°C fins el moment de la seva utilització.

2. Preparació del gel de poliacrilamida-SDS

Les electroforesis realitzades en aquest treball han estat d'una dimensió, en condicions desnaturalitzants (amb presència de SDS) i reductores (amb presència de DTT), seguint el sistema de tampons discontinu de Laemmli (285). El percentatge de poliacrilamida que normalment s'ha utilitzat ha estat del 10%, el que permet la separació de proteïnes compreses entre el rang de 10-80 kDa. Aquest percentatge augmenta com menor és el pes molecular de la proteïna d'interès.

El gel està format per dues parts, la superior amb el gel de concentració i la inferior amb el gel de resolució. La primera forma un entramat de porus de major tamany que permet concentrar totes les proteïnes de la mostra en un punt de manera que es comencen a separar al mateix temps, al gel de resolució.

- a) En primer lloc es prepara el gel que anirà a la part inferior, per tant el gel de resolució.
- b) S'introdueix entre els vidres i es deixa polimeritzant amb una capa de butanol/H₂O al límit superior, per evitar el contacte amb l'aire.
- c) Un cop polimeritzat s'elimina la capa de butanol/H₂O i es renta tres cops amb H₂O, procurant en l'últim rentat que quedi el màxim de sec.
- d) S'afegeix al damunt el gel superior, concentrador i es deixa polimeritzant amb la tinta introduïda, perquè es formin els pous.

3. Electroforesi

- a) Es col·loca el gel a la cubeta d'electroforesi i s'omple de tampó d'electroforesi.
- b) Es carreguen les mostres, les quals prèviament s'han homogenitzat amb el tampó de carrega i escalfat a 100°C durant 5 min, en el gel.
- c) Es crea el corrent elèctric mitjançant voltatge, que provoca el transport de les proteïnes. Generalment es connecta a 70 volts fins que les proteïnes han emigrat al gel de resolució, llavors es pot pujar el corrent fins a 100-150 volts.

4. Equilibratge i transferència

La transferència de proteïnes, de gels a membranes poroses absorbents s'ha realitzat per electroelució semiseca segons el descrit prèviament (286). Es tracta d'una transferència electroforètica en una direcció perpendicular al pla del gel, les proteïnes són absorbides en la membrana de nitrocel·lulosa que està en contacte amb la superfície del gel.

- a) Un cop les proteïnes han arribat al final, s'atura l'electroforesi. Es treu el gel i s'elimina la part superior.
- b) Es submergeix el gel, 12 papers watman i la membrana de nitrocel·lulosa (tallats de la mateixa mida que el gel) amb tampó de transferència durant 10 min.
- c) Seguidament es distribueixen en l'aparell de transferència de la següent forma: sis papers Watman on a sobre es col·loca el gel, la membrana i 6 papers més, evitant que quedin bombolles en les diferents capes.
- d) Es crea un corrent elèctric de 150 mA durant 20 min.
- e) Per comprovar la correcta transferència i senyalitzar les bandes dels marcadors de pes molecular, es tenyeix la membrana amb vermell Ponceau que tenyeix específicament les proteïnes.

1.3.3.- IMMUNODETECCIÓ

Un cop les proteïnes han estat transferides a la membrana, els antígens es troben accessibles a la interacció amb macromolècules, com les immunoglobulines. Així, la detecció d'una proteïna en concret es realitza per immunoreactivitat d'un anticòs específic per la proteïna, seguit de la interacció d'un segon anticòs que reconeix el primer i gràcies a l'enzim que duu acoblat, al afegir-hi el substrat dona una coloració o una reacció de quimioluminència que el permet detectar.

En aquest cas, la detecció s'ha utilitzat amb producte ECL, produint una reacció de quimioluminescència. L'enzim peroxidasa té la capacitat de catalitzar en presència de peròxid d'hidrogen, l'oxidació de luminol. El luminol oxidat es troba en estat excitat i dissipa l'energia mitjançant l'emissió de llum a una longitud d'ona de 428 nm, que permet ser detectable amb pel·lícules blaves autoradiogràfiques.

❖ Reactius

- TBS 20x pH 7,4
 - Tris 121 g
 - NaCl 175 g
 - H₂O destil·lada fins a 1L

Tant la solució de bloqueig com la solució pels anticossos s'afegeix al TBS 1x diluït amb H₂O destil·lada, detergent Tween-20 al 0,1% i llet en pols, a una concentració variable de 3 a 6% en funció de l'anticòs.
- Solució de revelat (ECL)
 - àcid coumaric 90mM 25 µl
 - luminol 250mM 50 µl
 - Tris 100 mM pH 8,5 10 ml
 - H₂O₂ 3 µl
- Anticòs primari
- Anticòs secundari conjugats amb peroxidasa

❖ Procediment

1. Es realitza el bloqueig de la membrana, per evitar les unions inespecífiques, amb la solució de bloqueig en agitació a temperatura ambient durant 30 min.
2. Incubació amb l'anticòs primari, durant 3h a temperatura ambient o 16h a 4°C en agitació.
3. Es fan tres rentats de 10 min amb solució de bloqueig.
4. Incubació amb l'anticòs secundari en agitació a temperatura ambient durant 2h
5. Es fan tres rentats amb TBS-Tween 0,2% de 10 min.
6. Incubació amb la solució de revelat (ECL) durant 1 min en agitació i tapat de la llum. Es crea una reacció enzimàtica on el producte quimioluminescent final es detecta mitjançant films autoradiogràfics.

1.3.4.- REUTILITZACIÓ DE LES MEMBRANES

Les membranes es poden reutilitzar varies vegades, per això cal que les membranes es guardin sempre a 4°C humides amb tampó TBS-T afegint 0,1% d'àcid sòdic per evitar contaminacions.

Aquesta pràctica és molt emprada per quantificar l'expressió de una proteïna, es fa una segona incubació de la membrana amb un anticòs contra una proteïna d'expressió constant, com l'actina. Posteriorment s'analitzen les bandes d'interès mitjançant programes densitomètrics, com el Quantity One.

❖ Reactius

- Tampó d'extracció
 - Tris-HCl pH 6,7 62 mM
 - β-mercaptoetanol 100 mM
 - SDS 2 %

❖ Equipament i material

- Bany tèrmic d'aigua (65°C)

❖ Procediment

1. Es submergeix la membrana en tampó d'extracció i s'incuba a 50-65°C durant 30-45 min en un bany d'aigua amb agitació constant.
2. Es fan varis rentats de 10 min amb abundant tampó TBS. Fins que s'olori el β-mercaptoetanol.
3. En aquest punt, la membrana ja està neta per poder fer una nova incubació.

1.4.- ESTUDIS DE SECRECIÓ

Per tal d'estudiar la secreció d'insulina dels illots isolats i infectats amb els lentivirus, s'ha utilitzat la tècnica d'incubació estàtica basada en la incubació dels illots durant 90 minuts en presència de substàncies estimuladores de la secreció. Al final de la incubació es mesura la quantitat tant d'hormona secretada com de la que resta als illots, el contingut.

❖ Reactius

- Solució I
 - NaCl 0,46 M
- Solució II
 - NaHCO₃ 0,096 M
 - KCl 0,02 M
 - MgCl₂ x 6 H₂O 0,004 M
- Solució III
 - CaCl₂ x 2 H₂O 0,004 M
- Albúmina sèrica bovina (BSA Fraction V) 0,5%
- Carbògen O₂ : CO₂
- Glucosa
- Solució àcid/etanol
 - HCl 10 mM 0,15%
 - Etanol 75%

❖ Equipament i material

- Lupa binocular
- Bany metabòlic amb moviment, a 37°C
- Vials de secreció

❖ Procediment

1. Es prepara la solució tampó de secreció, mesclant 22 ml de cada solució (I, II i III) amb 22 ml d'H₂O. Es deixa gasejant la solució amb carbògen durant 5 min. Seguidament s'hi afegeix el BSA a una concentració final de 0,5 % i es

comprova que el pH sigui de 7,4. A partir d'aquest tampó es preparen les solucions estimuladores que contenen glucosa a una concentració de 5,5 mM i 16,7 mM.

2. Els illots es pesquen sota la lupa binocular i es col·loquen, en grups de 8, en vials que contenen 1 ml de la solució tampó de secreció amb la concentració de glucosa corresponent.
3. S'incuben a 37°C en un bany metabòlic en agitació constant durant 90 minuts. Durant els 10 primers minuts, la solució d'incubació es manté gasejada amb carbògen.
4. Un cop finalitzat el temps d'incubació, es recull el tampó de secreció tenint cura de no aspirar cap illot i es guarda a -20°C fins el moment de la seva determinació.
5. Per tal de mesurar el contingut d'insulina que resta als illots, aquests es recullen en tubs de 3 ml, amb 500 µl de la solució àcid/alcohol. Es soniquen durant 20 seg. i es centrifuguen a 1000 g durant 10 min, a continuació, es recull el sobrenadant i es congela a -20°C fins el moment de la seva determinació.

1.5.- RADIOIMMUNOASSAIG D'INSULINA

Aquest RIA es basa en la competició que s'estableix entre la hormona marcada amb ¹²⁵I i la hormona no marcada de les diferents mostres per la unió a la quantitat fixa i limitada d'anticòs anti-insulina. Acabada la incubació, la quantitat d'insulina marcada unida a l'anticòs serà inversament proporcional a la quantitat d'insulina no marcada present a l'assaig. La separació de les fraccions lliure i lligada de la hormona es realitza mitjançant el mètode de l'anticòs doble.

❖ Reactius

- Kit Radioimmunoassaig d'insulina (CIS bio internacional, Gif-Sur-Yvette, França):
 - 125 I-Insulina humana
 - Estàndards d'insulina: 0; 5,5; 15; 35; 70; 175; 300 μ U/ml
 - Controls amb concentracions baixes i altes d'insulina
 - Solució tampó
- Solució tampó de dilució de les mostres (TSH)

NaCl	4,5 g
NaN ₃	0,5 g
BSA	2,5 g
Na ₂ HPO ₄	3,55 g
H ₂ O	fina a un volum final de 500 ml

❖ Equipament i material

- Comptador gamma (Packard, Canberra Company)

❖ Procediment

1. Es dilueixen les mostres a determinar, les de secreció i contingut d'insulina. Per tal que continguin una concentració compresa dins la corba patró del RIA.
2. Es reconstitueixen els reactius seguint les instruccions de la casa comercial. Cal que aquests estiguin com a mínim 30 min a temperatura ambient. Mentre, es preparen els següents tubs:

T	(determinació de l'activitat total)
Std	(estàndards, corba patró)
Controls	(mostra coneguda a baixa i alta concentració)
Sx	(mostres problema a analitzar)

3. S'afegeix a cada tub: 100 μ l de mostra (estàndard, control o mostra problema) i 1 ml d'insulina marcada prediluida. Es mescla amb un vòrtex i es deixa incubant de 18 a 20 h a temperatura ambient, tapant els tubs.

4. El dia següent, s'aspira el sobrenadant de cada tub, a excepció dels tubs T (que es guarden fins al moment del contacte). Es renten amb 4 ml d'H₂O destil·lada i es torna a aspirar el sobrenadant.
6. Es mesura la radioactivitat de cada tub en un comptador gamma.

Expressió dels resultats

Per a la determinació de la insulina humana o de ratolí, el RIA té un límit inferior de detecció de 2 µU/ml i un límit superior de 500 µU/ml. El coeficient de variació intrassaig és del 6,0% i interassaig del 8,0%.

L'aparell, mitjançant els valors de la corba estàndard calcula el valor de cada mostra, mostrant-los com a µU/ml. Els càlculs que s'han fet per expressar els resultats com a ng/illot han estat els següents:

$$\mu\text{U/ml} \times \text{dilució} \times 0,04 \text{ (insulina)} \div 8 \text{ (n}^\circ \text{ illots)} = \text{ng/illot}$$

$$\mu\text{U/ml} \times \text{dilució} \times 6 \text{ (insulina)} \div 8 \text{ (n}^\circ \text{ illots)} = \text{pmol/L} \cdot \text{illot}^{-1}$$

1.6.- ESTUDI DE LA MORFOLOGIA PER MICROSCOPIA ELECTRÒNICA

Per estudiar l'efecte funcional que podria causar l'enzim IDS, tant la seva sobreexpressió com la seva absència, es varen infectar les construccions lentivirals esmentades anteriorment en illots pancreàtics humans i s'estudià la seva morfologia per microscopi electrònic.

1.6.1.- FIXACIÓ DELS ILLOTS PEL MICROSCOPI ELECTRÒNIC

❖ Reactius

- Tampó fosfat (PB) a 0,1 i 0,2 M a pH 7,4
- Solució de fixació:
 - Paraformaldheid 4%
 - Glutaraldheid 1%
 - Tampó fosfat (PB) 0,1 M a pH 7,2
- Solució OsO₄ 4% / FeCNK 0,8%
- Etanol
- Resina: LR White

❖ Equipament i material

- Mottles per la polimerització
- Estufa a 40°C
- Recipient amb oli i ampolla de vidre pels residus d'Osmi
- Pincetes de precisió
- Reixetes de níquel

❖ Procediment

Un cop s'ha realitzat la infecció lentiviral i el cultiu dels illots, durant 24 hores a 24,4 i 3 mM de glucosa, es procedeix a la fixació:

1. S'aspira el medi de cultiu i es renten els illots en la placa amb PB 0,1 M pH 7,4
2. Es fixen els illots durant 1 h a temperatura ambient amb la solució de fixació.
3. Passat aquest temps, es traspassen els illots en un eppendorf i es centrifuga a 800 g durant 5 min, s'elimina el sobrenadant i es fan tres rentats de 15 min amb PB pH 7,4 fred (4°C).
4. A continuació té lloc la postfixació, es prepara en un falcon de 15 ml: 1 ml solució OsO₄ 4%, 1 ml PB 0,2 M pH 7,2 i 2 ml PB 0,1 M pH 7,4. Es traspassa

amb una pipeta Pasteur de vidre en els diferents eppendorfs que contenen els illots, es deixa 1h a 4°C.

5. Es fan tot un seguit de rentats amb PB 0,1 M.
6. Es procedeix a la deshidratació, fent els següents rentats, en agitació i a 4°C:

EtOH	50%	10 min
EtOH	70%	2 x 15 min
EtOH	80%	3 x 15 min

7. Seguidament té lloc la infiltració amb la resina:

1:1	LR White / EtOH 80%	1h	4°C
3:1	LR White / EtOH 80%	1h	4°C
	LR White	16h	4°C

8. Abans de fer la polimerització, es deixa la mostra a temperatura ambient i s'afegeix LR White atemperat..
9. Els illots es traspassen de l'eppendorf a uns motlles i es col·loquen a l'estufa a 40°C durant 48h.
9. Es treuen les mostres i es fan talls de 80-100 nm per secció que es dipositen en reixetes de níquel.

1.6.2.- IMMUNOMICROSCÒPIA ELECTRÒNICA

Per poder detectar els grànuls de cèl·lula β , s'ha optat per fer el marcatge de l'amilina.

❖ Reactius

- Tampó fosfat salí (PBS) 0,1M a pH 7,2

Fosfat monosòdic (NaH_2PO_4)	0,2M	36 ml
Fosfat bisòdic ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$)	0,2M	14 ml
H_2O destilada		50 ml

NaCl 0,9 g

- Ovoalbúmina
- Anticòs primari: policlonal anti-IAPP humana (cedit per A. Clarck, University of Oxford)
- Proteïna A marcada amb or (15 nm)

❖ Equipament i material

- Parafilm
- Pinces de precisió

❖ Procediment

1. Rentar els talls amb H₂O destil·lada durant 5 min (tots els rentats es fan posant una gota en el parafilm i el tall amb la mostra a sobre i tapat per evitar la pols).
2. Es fa el bloqueig amb solució PBS/Ovoalbúmina durant 30 min.
3. S'incuba amb l'anticòs primari durant 2h
4. Es fan tres rentats de 5 min amb solució de bloqueig
5. S'incuba amb la proteïna A marcada en or a una dilució de 1/50 durant 1h.
6. Es fa un rentat de 15 min i dos de 5 min amb solució de bloqueig.
7. Finalment es fan tres rentats de 5 min amb H₂O bidestil·lada

1.6.3.- OBSERVACIÓ AMB EL MICROSCOPI ELECTRÒNIC

❖ Reactius

- Acetat d'uranil al 2% en H₂O pH 4
- Citrat de plom
- NaCl

❖ Equipament i material

- Microscopi electronic JEOL (EM 15007)

❖ Procediment

Abans de poder observar les mostres pel microscopi cal contrastar-les. Es segueix el següent protocol:

1. S'incuben les mostres amb acetat d'uranil al 2% durant 35 min i tapat de la llum.
2. Es fan varis rentats amb H₂O destil·lada
4. Es prepara en una placa de Petri una gota per mostra de citrat de plom (prèviament filtrat) i al voltant perquè absorbeixi pastilles de NaCl.
5. Es tornen a fer rentats amb H₂O.
6. A continuació s'estudien les mostres amb el microscopi electrònic

2.- RESULTATS III

2.1.- EXPRESSIÓ DELS VECTORS LENTIVIRALS

Tal i com s'ha comentat a la secció anterior, es varen utilitzar els lentivirus com a sistema de transferència gènica. Els lentivirus que s'han fet servir en aquest objectiu han estat: lentivirus amb el fragment d'IDS en sentit sense a fi d'aconseguir un augment de l'expressió de la proteïna, lentivirus que contenen l'IDS en sentit antisense a fi d'aconseguir l'efecte contrari i lentivirus amb la proteïna fluorescent verda com a control tant de la infecció com de l'efecte dels lentivirus.

El fragment de la seqüència d'IDS que s'ha utilitzat com a IDS sense es representa a la Figura 3.1. El mateix fragment però sintetitzat i clonat en sentit contrari ha estat l'utilitzat com a IDS antisense.

El fragment d'IDS que s'ha clonat al vector de traducció per la posterior formació dels lentivirus, s'ha obtingut a partir de l'amplificació als illots humans, la seqüència correspon al mRNA IDS humà (Genbank NM_000202). La seqüència genòmica de l'IDS de ratolí traduïda (Genbank NM_010498) té una homologia del 85% amb la seqüència humana i, la seqüència proteica entre les dues espècies té una identitat del 89% (216), per tant és d'esperar que els lentivirus contenint la seqüència d'IDS humana siguin eficients als illots de ratolí. Tot i així, és necessari comprovar l'expressió de l'IDS als illots pancreàtics de ratolí i als illots humans, infectats amb els lentivirus.

³⁰¹gccgctctga agcggccgcg tcgaagccgā **aatgccgcca CCccggaccg** gccgaggcct tctctggctg ³⁷¹ggcttggttc
 tgagctccgt ctgctgcc ctcggatccg aaacgcaggc caactcgacc acagatgctc tgaacgttct ⁴⁵¹tctcatcacc gtggatgacc
 tgcgccctc cctgggctgt tatggggata agctgggtgag gtccccaaat atgaccaac ⁵³¹tggcatcca cagectctc ttccaagaat
 cctttgcga gcaagcagtg tgcgccccga gccgcgttc tttctcact ⁶¹¹ggcaggagac ctgacaccac ccgctgtac gacttcaact
 cctactggag ggtgcagct ggaacttct ccaccatcc ⁶⁹¹ccagtactc aaggagaatg gctatgtgac catgtcggtg ggaaaagtct
 ttcacctgg gatattctt aaccataccg ⁷⁷¹atgattctc gtagctgg tctttccac ctatcatcc ttctctgag aagatgaaa
 aactaagac atgtcgaggg ⁸⁵¹ccagatggag aactccatgc caacctgct tgcctgtgg atgtgctgga tftcccagag ggcacctgc
 ctgacaaca ⁹³¹gagcactgag caagccatac agttgttga aaagatgaaa acgtcagcca gtccttctt cctggccgtt gggatcata
¹⁰¹¹agccacacat cccctcaga taccccaagg aatttcagaa gttgtatcc ttggagaaca taccctggc ccccgatcc ¹⁰⁹¹gagtcctg
 atggcctacc cctgtggcc tacaacctt gtaggacat caggcaacgg gaagacgtcc ¹¹⁶¹aagcctaaa catcagtgct ccgatggc
 caattctgt ggacttcag cggaaaatcc gccagagta ctttgcctt ¹²⁴¹gtgcatatt tggatacaca ggtcggccg ctcttgagtg
 ctttggaca tctcagctg gccaacgca ccatcattg ¹³²¹atttacctg gatcatgggt gggctctagg tgaacatgga gaattggcca
 aatacagaa ttttgatgt gctaccatg ¹⁴⁰¹ttcccctgat attctatgt cctggaagga cggcttact tccggaggca ggcgagaagc
 tttccctta cctcgacct ¹⁴⁸¹ttgatccg cctcacagt gatggagcca ggcaggcaat ccatggacct tttggaact gtgtcttt
 ttcccagct ¹⁵⁶¹ggctggact gcaggactgc aggtccacc tctgtcccc gttcctcat ttcacttga gctgtcaga gaaggcaaga
¹⁶⁴¹acctctgaa gcatttcca tccgtgact tgaagagga tccgtacct cctggtaat cccgtgaact gattgcctat ¹⁷²¹agccagatc
 cccggcctc agacatccct cagtggaatt ctgacaagcc gagtttaaaa gatataaaga tcatgggcta ¹⁸⁰¹ttccatacgc accatagact
 ataggtatac tgtgtgggtt ggcttcaat ctgatgaatt tctagctaac tttctgaca ¹⁸⁸¹tccatgcagg ggaactgtat tttgtgatt
 ctgaccatt gcaggatcac aatatgata atgattcca aggtggagat ¹⁹⁶¹cttt**ccagt tgttgat**gcc ttgagtttg ccaacctgag
 atggcaaatg tgatgtctc cttccagct ggtgagagga

Figura 3.1. Fragment d'IDS humà. Es representa la seqüència de l'IDS (1645 pb), anomenada IDS sense, que s'ha amplificat per ser expressada als illots humans i de ratolí, mitjançant la infecció amb els lentivirus. La mateixa seqüència però en sentit contrari ha estat clonada com a IDS antisense.

2.1.1.- EXPRESSIÓ DELS LENTIVIRUS ALS ILLOTS PANCREÀTICS DE RATOLÍ

A la Figura 3.2 es mostra el contingut de mRNA d'IDS als illots pancreàtics de ratolí infectats. L'expressió de l'IDS als illots infectats amb lentivirus-EGFP és molt similar a la dels illots no infectats, per tant ens indica que el vector lentiviral no provoca cap efecte sobre el contingut d'IDS.

En canvi, quan els illots s'han infectat amb els lentivirus que contenen el fragment d'IDS en sentit sense, l'expressió d'aquest gen augmenta un 70 % en

relació als illots control ($172,5 \pm 9,7$ % versus al $100,6 \pm 1,1$ % dels illots no infectats, $p \leq 0,05$). De la mateixa manera, els illots infectats amb lentivirus amb el constructe de l'IDS antisense mostren una reducció del 43 % de l'expressió de l'IDS en relació als illots no infectats ($52,8 \pm 5,5$ % versus $100,6 \pm 1,1$ %, $p \leq 0,05$). Per tant, s'ha comprovat que els lentivirus, tant el que conté l'IDS sense com l'IDS antisense, provoquen una variació de l'expressió del mRNA de l'IDS als illots de ratolí.

Per saber si aquesta expressió de l'IDS a nivell transcripcional, produïda per la infecció amb els lentivirus, es correspon de la mateixa manera a nivell proteic, s'ha analitzat l'expressió de l'IDS als illots de ratolí infectats, mitjançant *western blot* (Figura 3.3).

La banda corresponent a l'IDS de 55 KDa es detecta només als illots infectats amb els lentivirus-IDS sense. Es pot observar una absència de banda als illots no infectats, això no és degut a la falta d'expressió de l'IDS endògen, sinó a una limitació de l'anticòs policlonal utilitzat per a la detecció de l'IDS, el qual només detecta l'expressió abundant de l'IDS, com succeeix en el primer cas comentat.

S'ha quantificat per densitometria (*Quantity One*) que la senyal corresponent a l'IDS als illots infectats amb els lentivirus-IDS antisense, és 30 vegades menor a l'obtinguda als illots que expressen l'IDS sense.

A fi d'analitzar l'eficiència del constructe antisense pel que fa al bloqueig de l'expressió de l'IDS i, degut a la falta de senyal als illots control, es van coinfectar els illots amb els dos vectors lentivirals, el que conté l'IDS sense i l'IDS antisense. Es pot observar que l'expressió de l'IDS disminueix significativament, de l'ordre de les 20 vegades, en relació als illots infectats amb el constructe IDS sense (Figura 3.3)

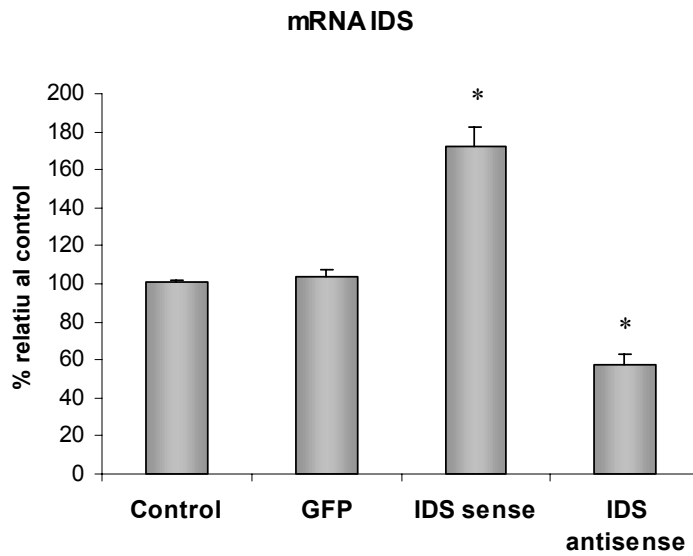


Figura 3.2. Contingut del mRNA d'IDS als illots de ratolí infectats.

S'ha comprovat l'efecte produït pels lentivirus sobre l'expressió de l'IDS als illots pancreàtics de ratolí no infectats (control); infectats amb lentivirus-EGFP (GFP); amb lentivirus-IDS sense (IDS sense) o amb els lentivirus-IDS antisense (IDS antisense). Els valors representen la mitja \pm SEM de tres experiments independents. * $p \leq 0,05$.

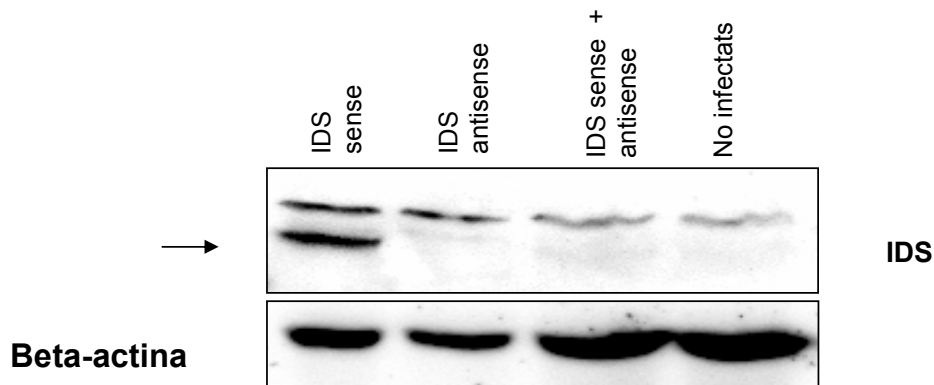


Figura 3.3. Detecció de l'IDS per *western blot* als illots infectats.

La banda de 55 KDa corresponent a l'IDS es detecta només als illots infectats amb l'IDS sense. L'expressió de la proteïna beta-actina s'observa a les diferents mostres analitzades.

2.1.2.- EXPRESSIÓ DELS LENTIVIRUS ALS ILLOTS PANCREÀTICS HUMANS

A la següent figura (3.4) es mostra un illot pancreàtic humà infectat amb el lentivirus que conté la proteïna fluorescent verda (EGFP). S'observa com la proteïna transfectada s'expressa a diferents nivells de l'illot, i que per tant, el sistema lentiviral és capaç d'infectar tant les cèl·lules més exteriors de l'illot, com penetrar a les cèl·lules que es troben a l'interior de l'illot.

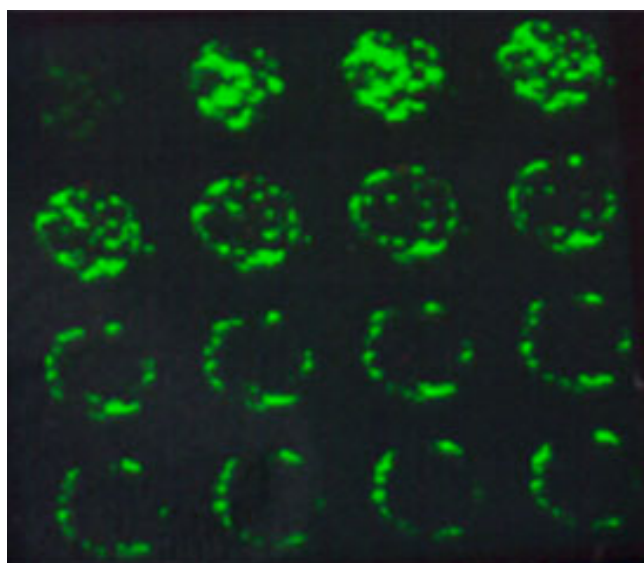


Figura 3.4. Expressió de la proteïna fluorescent verda als illots humans.

Es mostra la imatge obtinguda en diferents talls de l'illot amb el microscopi confocal.

L'anàlisi de l'expressió de l'IDS als illots pancreàtics humans (Figura 3.5) mostra increment del 110% del contingut del mRNA d'IDS als illots infectats amb el vector lentiviral que conté l'IDS sense, en relació amb els illots control no infectats ($200,4 \pm 22,6$ versus $95,35 \pm 4,65$ dels illots control). De la mateixa manera, els illots infectats amb el constructe IDS antisense, el contingut del mRNA d'IDS disminueix un 40% respecte als illots control ($60,15 \pm 13,05$ vers $95,35 \pm 4,65$).

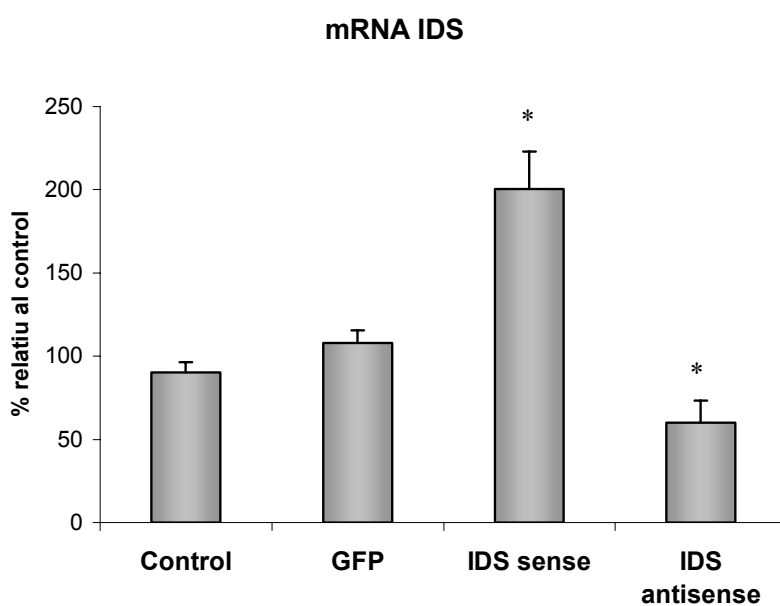


Figura 3.5. Contingut de mRNA d'IDS als illots humans infectats.

Quantificació per PCR a temps real de l'abundància del mRNA d'IDS als illots humans no infectats (control); infectats amb lentivirus-EGFP (GFP); amb lentivirus-IDS sense (IDS sense) o lentivirus-IDS antisense (IDS antisense). Els valors representen la mitja \pm SEM de tres experiments independents. * $p \leq 0,05$.

2.2.- EFECTE DE L'IDS SOBRE LA FUNCIO SECRETORA D'INSULINA ALS ILLOTS DE RATOLI

A fi de determinar quin paper juga l'enzim IDS en el mecanisme secretor de l'insulina als illots de ratolí, es va induir la sobreexpressió de l'enzim (mitjançant la infecció amb el lenti-IDS sense) i el bloqueig de la seva expressió (a partir del lenti-IDS antisense). En ambdós casos es va estudiar la secreció i contingut d'insulina. Al mateix temps, es va utilitzar com a controls, illots no infectats i illots infectats amb lentivirus-EGFP.

Com es mostra a la Figura 3.6, la infecció dels illots amb els vectors lentivirals, en aquest cas contenint la proteïna fluorescent verda (EGFP) no provoca diferències en la secreció d'insulina al comparar-ho amb els illots no infectats. L'increment en la secreció d'insulina dels illots, en resposta a l'alta concentració de glucosa (16,7 mM), no es troba afectada per la presència de l'IDS sense o de l'IDS antisense. En les diferents condicions experimentals aquest increment és del 50% ($p \leq 0,05$ en relació a la concentració basal de glucosa, 5 mM).

L'estudi del contingut intracel·lular d'insulina als mateixos illots utilitzats pels experiments de secreció, ens mostra que quan els illots han estat infectats amb el constructe IDS antisense el contingut d'insulina es redueix un 35% ($p \leq 0,001$) a 5,5 mM de glucosa i un 46% ($p \leq 0,001$) a 16,7 mM de glucosa (Taula 3.1). No obstant, a la resta de condicions no hi ha variacions significatives en el contingut d'insulina. La secreció fraccional d'insulina dels illots no infectats en situació basal és del 0,92%, mentre que en situació d'estimulació aquest percentatge augmenta fins al 1,81% ($p \leq 0,05$, vers 5,5 mM glucosa). A la resta de condicions, aquests valors són molt similars, excepte als illots infectats amb l'IDS antisense que són lleugerament superiors però no estadísticament significatius.

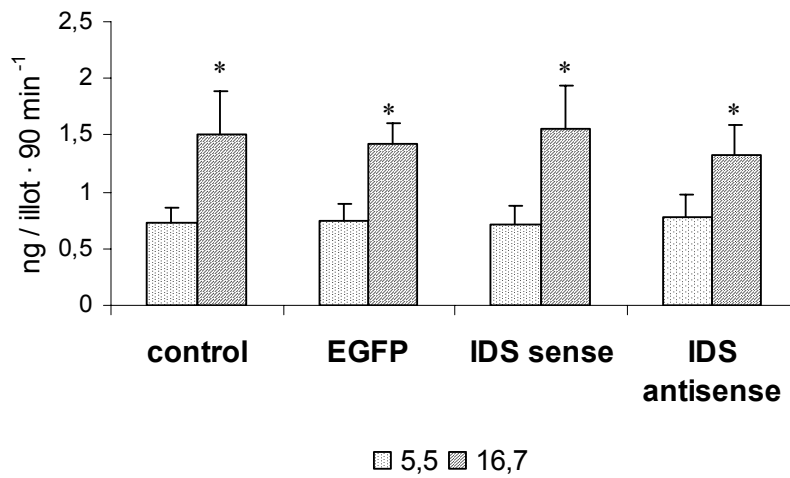


Figura 3.6. Secreció d'insulina dels illots de ratolí infectats.

S'ha estudiat la quantitat d'insulina alliberada al medi per RIA d'illots de ratolí no infectats (control) i illots infectats amb els lentivirus que contenen la proteïna fluorescent verda (EGFP), IDS sense o IDS antisense, després d'haver-los incubat durant 90 minuts a 5,5 mM i 16,7 mM de glucosa. Els valors són la mitja \pm SEM de 12 determinacions que provenen de tres isolaments d'illots independents. Les significàncies estadístiques s'han avaluat amb el test t de Student per a dades no aparellades, i es representa:

* $p \leq 0,05$, comparat amb els illots amb les mateixes condicions incubats a 5,5 mM de glucosa.

Condicions	5,5 mM glucosa		16,7 mM glucosa	
	Contingut ng / illot · 90 min ⁻¹	Alliberament fraccional %	Contingut ng / illot · 90 min ⁻¹	Alliberament fraccional %
Control ^a	79,10 ± 4,6	0,92 ± 0,19	82,68 ± 4,8	1,81 ± 0,36 ^d
Lenti-EGFP	72,55 ± 4,1	1,03 ± 0,15	72,44 ± 5,1	1,97 ± 0,18 ^d
Lenti-IDS sense	72,57 ± 5,5	0,99 ± 0,20	74,67 ± 4,9	2,08 ± 0,48 ^d
Lenti-IDS antisense	51,18 ± 3,1 ^b	1,58 ± 0,47	44,14 ± 3,1 ^{b,c}	2,77 ± 0,51 ^d

Taula 3.1. Contingut i secreció d'insulina d'illots pancreàtics de ratolí.

S'ha determinat el contingut intracel·lular d'insulina dels illots de ratolí utilitzats en els experiments de secreció de la Figura 3.6. La secreció fraccional (expressada en percentatge) s'ha calculat dividint els valors de secreció de cada condició experimental pels continguts d'insulina respectius. Els valors representen la mitja ± SEM de 12 determinacions que provenen de tres isolaments d'illots independents.

^a Control: illots no infectats

^b $p \leq 0,001$ comparat amb el illots control a 5,5 mM glucosa.

^c $p \leq 0,001$ comparat amb el illots control a 16,7 mM glucosa.

^d $p \leq 0,001$ comparat amb els illots amb les mateixes condicions a 5,5 mM glucosa.

2.3. EFECTE DE L'IDS SOBRE LA MORFOLOGIA DELS ILLOTS PANCREÀTICS HUMANS.

Per analitzar quin efecte produeix l'IDS sobre l'estructura morfològica dels illots pancreàtics, s'ha analitzat per microscòpia electrònica, els illots infectats i cultivats durant 24 hores a alta (24,4mM) i baixa (3mM) concentració de glucosa. La detecció dels grànuls secretors de la cèl·lula β , s'ha realitzat mitjançant la immunodetecció de l'amilina.

Les imatges obtingudes mostren la presència de partícules d'or en alguns grànuls de secreció, però principalment als lisosomes, degut a la gran abundància d'amilina que s'hi troba en aquest orgànul durant el procés de degradació de l'amilina. Això indica que l'anticòs contra l'amilina utilitzat només és capaç de detectar l'amilina quan aquesta es troba a una concentració elevada. No obstant les imatges mostren evidents canvis a l'estructura morfològica de l'illot.

No s'han obtingut diferències importants entre els illots cultivats a alta i baixa concentració de glucosa, a les diferents condicions experimentals estudiades. El simple cultiu dels illots a concentracions altes de glucosa, no ha afavorit la formació de fibretes i els illots no tractats mostren una morfologia normal (Figura 3.7A). Quan els illots han estat infectats amb els lentivirus-IDS sense, tampoc s'observa que es produeixi cap canvi important (Figura 3.7B). No obstant, el dèficit en l'expressió de l'IDS, provoca un deteriorament de la morfologia dels illots (Figura 3.7C). L'aspecte general dels illots infectats amb el constructe IDS antisense, indica que hi ha un increment de lisosomes (Figura 3.8), així com un augment de la mida d'aquests lisosomes (Figura 3.8). Al mateix temps, s'incrementen les imatges de crinofàgia, on els grànuls secretors d'insulina són digerits pels lisosomes (Figura 3.9).

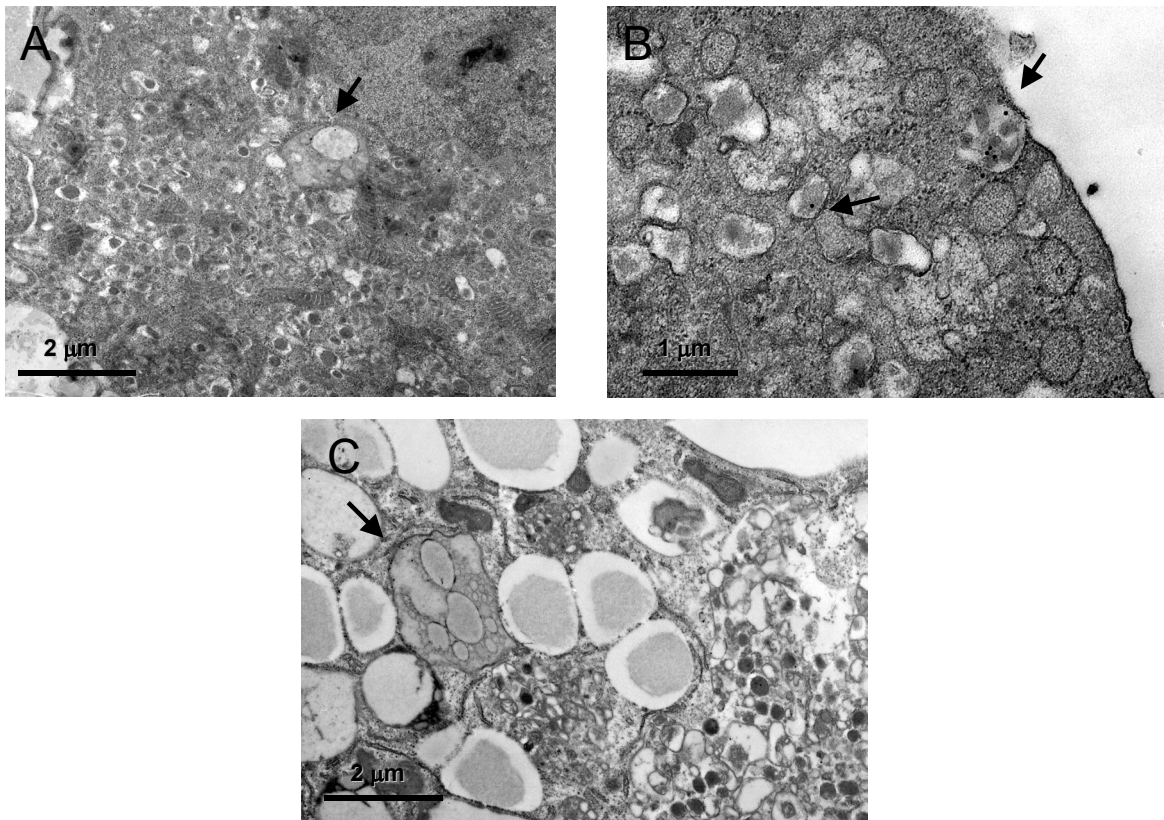


Figura 3.7. Immunomicroscòpia electrònica de illots humans.

(A) no tractats; (B) infectats amb els lentivirus-IDS sense; (C) infectats amb els lentivirus-IDS antisense. Els illots han estat fixats i tractats per microscopia electrònica tal com es descriu a l'apartat de materials i mètodes. La immunoreactivitat contra l'amilina ha estat detectada amb proteïna A conjugada amb or de 15 nm (indicat amb fletxes).

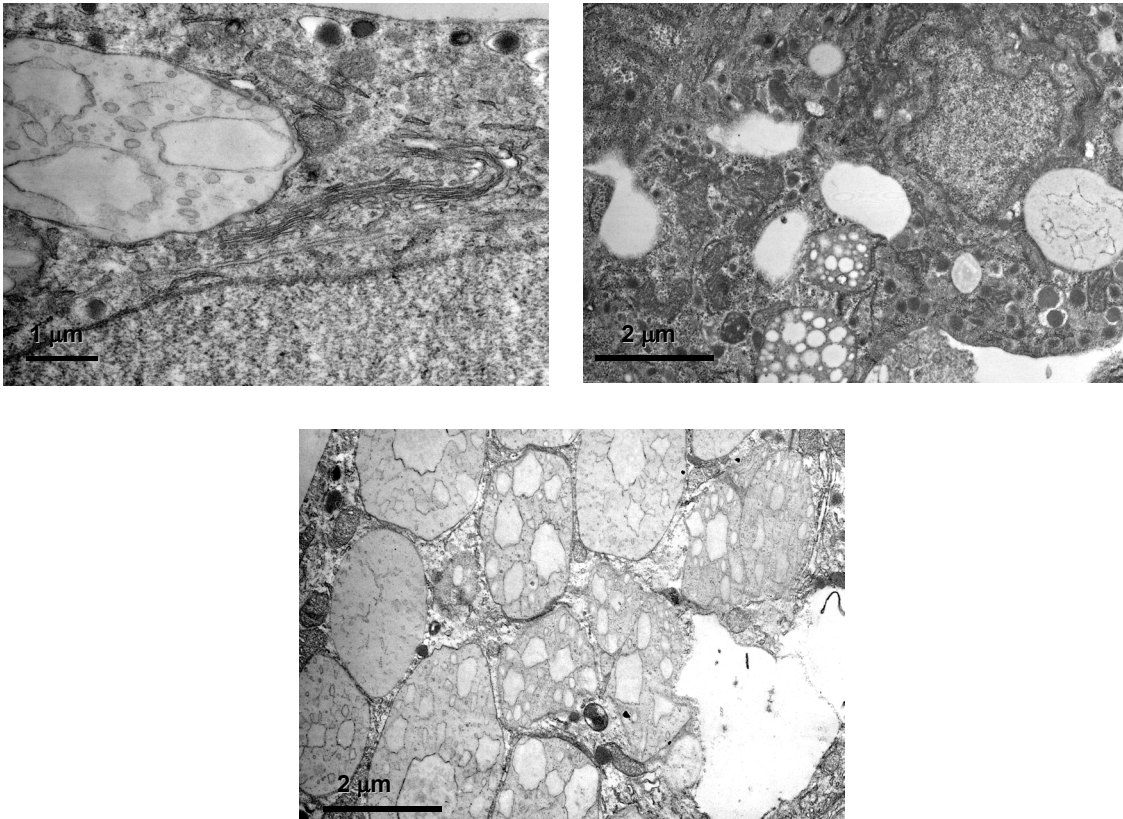


Figura 3.8. Microscòpia electrònica dels illots humans infectats amb lentivirus-IDS antisense. Es mostra un augment de la mida i de la població lisosomal.

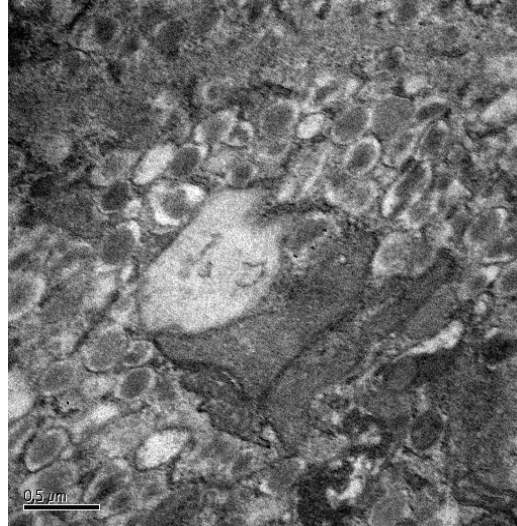
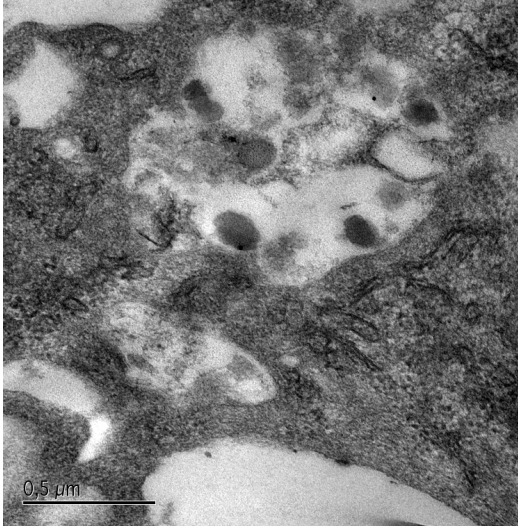


Figura 3.9. Microscòpia electrònica dels illots humans infectats amb lentivirus-IDS antisense. Es mostren diverses imatges de crinofàgia.

3.- DISCUSSIÓ III

El sistema de transferència gènica mitjançant els vectors lentivirals, ha demostrat en estudis *in vitro*, tenir una alta eficiència de transfecció tant a les cèl·lules en divisió, com a les cèl·lules que no es poden dividir, com neurones, cèl·lules retinals, cèl·lules musculars, cèl·lules hematopoiètiques pluripotents o cèl·lules de l'illot pancreàtic (287-292). En aquest sentit, estudis *in vivo* han observat que la transfecció de gens mitjançant aquest sistema és capaç de revertir la malaltia, causada per un gen en concret, com per exemple la leucodistrofia metacromàtica (293), la mucopolisacaridosis tipus VII (294), o bé, la mucopolisacaridosis tipus II (241).

Com s'ha comentat prèviament, aquest sistema de transferència gènica basat en el virus HIV (virus humà de la immunodeficiència), permet transduir en cèl·lules que no es divideixen, mantenint l'expressió del gen transfectat durant mesos. Estudis previs on s'han infectat illots pancreàtics humans mitjançant vectors lentivirals, han demostrat que l'eficiència d'infecció a les cèl·lules β de l'illot pancreàtic intacte és superior al 50% (294-296). Tanmateix, altres estudis opten per infectar les cèl·lules dels illots pancreàtics disgregades (297,298), en les quals s'obté una eficiència d'infecció del 62%. En el nostre cas, vàrem infectar els illots pancreàtics intactes, per tal de mantenir la seva estructura morfològica.

La infecció amb els lentivirus-IDS sense provoca un augment de l'expressió de l'IDS del 70 i 110% als illots de ratolí i humans respectivament. Uns valors suficientment elevats per tal d'estudiar l'efecte de l'augment de l'expressió de l'IDS als illots pancreàtics. En canvi, el bloqueig de l'expressió de l'IDS amb els lentivirus IDS-antisense, provoca una reducció del 40% a les dues espècies analitzades, per tant, cal tenir present que amb aquest sistema s'aconsegueix una reducció de l'expressió de l'IDS, però en cap cas una inhibició de la mateixa.

En els estudis de secreció i contingut d'insulina, es demostra que els vectors lentivirals *per se*, en aquest cas els lentivirus contenint la proteïna verda, no provoquen cap efecte sobre la funció secretora de l'illot, en relació als illots que no han estat infectats. Tanmateix, existeixen altres evidències experimentals, que demostren que el sistema d'infecció amb lentivirus no altera la funció secretora d'insulina en relació a la concentració de glucosa (292). Per tant, podem suposar que els vectors lentivirals tampoc afecten a la morfologia de l'illot pancreàtic, i els canvis observats en aquesta part de l'estudi, han estat produïts com a conseqüència de l'expressió, augmentada o reduïda, de l'IDS. En aquest cas, no ha estat possible realitzar l'experiment de microscopia electrònica a illots humans infectats només amb els lentivirus-EGFP, degut a la limitació alhora de disposar d'illots humans pels treballs d'investigació.

D'altra banda, un excés de l'expressió de l'IDS tampoc produeix cap canvi ni en la secreció ni en el contingut d'insulina dels illots de ratolí. El fet de no haver pogut determinar l'activitat enzimàtica de l'IDS als illots pancreàtics, degut a dificultats tècniques, ha limitat l'estudi d'aquest objectiu. Podríem considerar que un augment de l'expressió del mRNA d'IDS es tradueix en un increment de l'activitat enzimàtica, i per tant els resultats obtinguts ens indicarien que un augment de la degradació del perlecan no provoca cap canvi aparent a la funció secretora de l'illot. No obstant, no es pot descartar la possibilitat que l'activitat enzimàtica de l'IDS no hagués variat tot i l'augment de l'expressió de l'IDS.

En tot cas, s'ha demostrat que l'increment de l'expressió de l'IDS no produeix cap alteració a l'estructura morfològica de l'illot. Els canvis més destacats s'han observat als illots infectats amb el constructe IDS antisense, els quals, tot i que la resposta secretora d'insulina no mostra cap alteració, el contingut d'insulina s'observa significativament reduït en relació a les altres condicions experimentals, tant a alta com a baixa concentració estimuladora de glucosa. L'alliberament

fraccional indica el valor de secreció d'insulina en relació al contingut, als illots infectats amb els lenti-IDS antisense, s'observa una secreció fraccional més elevada tot i que no estadísticament significativa en relació als illots no infectats, degut a que tot i contenir menys insulina es secreta el mateix. És d'esperar però, que a llarg termini la secreció d'insulina d'aquests illots també estigués afectada.

L'estudi de microscopia electrònica dels illots humans infectats amb els lenti-IDS antisense, mostren una alteració de la morfologia de l'illot. S'observa una estructura totalment anòmala de la cèl·lula β . Augmenta el volum i el número de lisosomes, principalment la població de lisosomes secundaris. Aquest increment de l'activitat lisosomal va acompanyada d'un augment de la degradació dels grànuls secretors per part dels lisosomes, o sigui, de la crinofàgia. Totes aquestes observacions ens permeten hipotetitzar que el dèficit de l'expressió d'IDS provocaria la disminució de la seva activitat enzimàtica, la qual cosa, alteraria la degradació del perlecan, de manera que el perlecan s'acumularia als lisosomes i podria estimular l'activitat crinofàgica dels lisosomes. Aquesta hipòtesi explicaria la disminució del contingut d'insulina observada als illots de ratolí, i afavoreix la idea que a llarg termini, hi hauria una disminució de la secreció d'insulina.

L'efecte que produeix la baixa expressió d'IDS, als illots pancreàtics, sobre l'estabilitat lisosomal de la cèl·lula β , és molt similar al produït per les concentracions baixes de glucosa (24,25,299), on s'ha observat un augment de la crinofàgia com a conseqüència de la diferent sensibilitat per la glucosa entre la biosíntesi d'insulina i la seva secreció, resultant una acumulació intracel·lular de grànuls secretors d'insulina (300).

El simple cultiu dels illots humans amb glucosa a 24,4 mM, durant 24 hores, no aconsegueix formar fibretes d'amilina, per tant, no es produeix un model d'amiloidogènesis, tot i que previs estudis del nostre grup amb col·laboració amb la

Dra. A. Clark de la Universitat d'Oxford, havien demostrat el contrari. Això implica que no ha estat factible analitzar el possible efecte preventiu de l'IDS, a través de la disminució dels nivells de perlecan, evitant l'amiloidogènesis. D'altra banda, la disminució del contingut d'IDS a la cèl·lula β dels illots humans, tampoc afavoreix la formació de fibrilles d'amilina. Per tant, en base al model establert no es pot concloure que l'IDS tingui un efecte directe sobre la formació de l'amiloid.

S'ha demostrat que la falta d'expressió de l'IDS provoca una alteració de la funció secretora d'insulina a la cèl·lula β pancreàtica, a través del mecanisme de crinofàgia dels lisosomes. L'augment de la crinofàgia, provoca un increment d'amilina al lisosoma, i al mateix temps, també es produeix una acumulació de perlecan, degut a la disminució de la seva degradació. Tot i que no s'han detectat fibretes als lisosomes, a llarg termini, quan es mor la cèl·lula β i els lisosomes són alliberats, la unió entre amilina o pro-amilina i el perlecan, que s'hauria donat als lisosomes, podria actuar com a nucli per a la formació de fibretes a l'espai extracel·lular.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. L'iduronat-2-sulfatasa es localitza als illots pancreàtics, tant de ratolí com d'humà.
2. S'ha detectat l'expressió de l'IDS a cèl·lules β i cèl·lules α pancreàtiques.
3. L'enzim IDS es localitza als lisosomes de la cèl·lula β pancreàtica.
4. El contingut del mRNA d'IDS, als illots pancreàtics de ratolí, està regulat pels senyals metabòlics derivats del metabolisme intracel·lular de la glucosa. L'estimulació de l'expressió de l'IDS provocada per la glucosa, té lloc en presència de proteïnes sintetitzades *de novo* i a través d'un mecanisme transcripcional.
5. La glucosa no produeix cap estimulació del mRNA d'IDS als illots pancreàtics humans.
6. El contingut del mRNA del perlecan no està regulat per la glucosa, ni als illots humans ni als illots de ratolí.
7. L'augment de l'expressió de l'IDS als illots pancreàtics, no produeix cap modificació en la funció secretora de la cèl·lula β pancreàtica de ratolins, ni en la morfologia dels illots humans.
8. La reducció de l'expressió de l'IDS als illots pancreàtics de ratolí, provoca una disminució significativa del contingut d'insulina.

9. Aquesta mateixa reducció, als illots pancreàtics humans, provoca un augment de la població lisosomal acompanyat d'un increment de la crinofàgia.

BIBLIOGRAFIA

1. Volk BW, Wellman KF (1985) Histology, cell types and functional correlation of islet of Langerhans. A: The diabetic pancreas. Zona edició (Volk BW, Arquilla ER, eds). Plenum medical Book Company, New York, 81-106.
2. Lifson N, Lassa CV, Dixit PK (1985) Relation between blood flow and morphology in islet organ of rat pancreas. *Am J Physiol* 249: E43-E48.
3. Jansson L, Hellerstrom C (1983) Stimulation by glucose of the blood flow to the pancreas islets of the rat. *Diabetologia* 34: 45-50.
4. Bonner-Weir S, Orci L (1982) New perspectives on the microvasculature of the islet of Langerhans in the rat. *Diabetes* 31: 883-889.
5. Stagner JI, Samols E, Bonner-Weir S (1988) B>A>D pancreatic islet cellular perfusion in dogs. *Diabetes* 37: 1715-1721.
6. Stagner JI, Samols E, Marks V (1989) The anterograde and retrograde infusion of glucagons antibodies suggest that A cells are vascular perfused D-cells within the rat islet. *Diabetologia* 32: 203-206.
7. Baileys EM, Guest P, Hutton JC (1992) Insulin biosynthesis. A: Insulin. Molecular biology to pathology (Ashcroft FM, and Ashcroft SJH, ed.), Oxford University Press, Oxford, 97-150.
8. Guest P, Hutton JC (1992) Biosynthesis of insulin secretory granule proteins. A: Nutrient regulation of insulin secretion (Flatt PR, ed.) Portland Press, London and Chapel Hill, 59-75.
9. Hutton JC, Peshavaria M (1982) Proton-translocating Mg^{+2} dependent ATPase activity in insulin-secretory granules. *Biochem J* 204: 161-170.
10. Hutton JC (1982) The internal pH and membrane potential of the insulin-secretory granule. *Biochem J* 204: 171-178.
11. Rorsman P, Ammala C, Berggren PO, Bokvist K, Larsson O (1992) Cytoplasmic calcium transients due to single action potentials and voltage-clamp depolarizations in mouse pancreatic B-cells. *EMBO J* 11: 2877-2884.
12. Sato Y, Aizawa T, Komatsu M, Okada N, Yamada T (1992) Dual functional role of membrane depolarisation/ Ca^{+2} influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes* 41: 438-443.
13. Gembal M, Gilon P, Henquin JC (1992) Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K^{+} channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 89: 1288-95.
14. Best L, Yates AP, Tomlinson S (1992) Stimulation of insulin secretion by glucose in the absence of diminished potassium ($86Rb^{+}$) permeability. *Biochem Pharmacol* 43: 2483-5.
15. Corkey BE, Glennon MC, Chen KS, Deeney JT, Matschinsky FM, Prentki M (1989) A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 264: 21608-12.
16. Prentki M, Vischer S, Glennon MC, Regazzi R, Deeney JT, Corkey BE (1992) Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem* 267: 5802-10.
17. Chen S, Ogawa A, Ohneda M, Unger RH, Foster DW, McGarry JD (1994) More direct evidence for a malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase I interaction as a key event in pancreatic beta-cell signaling. *Diabetes* 43:878-83.

18. Komatsu M, Schermerhorn T, Aizawa T, Sharp GW (1995) Glucose stimulation of insulin release in the absence of extracellular Ca²⁺ and in the absence of any increase in intracellular Ca²⁺ in rat pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10728-32.
19. Komatsu M, Schermerhorn T, Straub SG, Sharp GW (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide, carbachol, and glucose stimulate insulin release in the absence of an increase in intracellular Ca²⁺. *Mol Pharmacol* 50: 1047-54.
20. Malaisse WJ, Orci L (1979) The role of the cytoskeleton in pancreatic B cell function. In Gabbiani G (ed.) *Methods of archiverments in experimental pathology*, vol 9. Basel: Karger, pp 112-136.
21. Reusens B, Hoet JJ, Remacle C. Diabetes mellitus, carbohydrate metabolism, and lipid disorders. Ed. Rubenstein AH. Chapter 47: Anatomy, development biology, and parthology of the pancreatic islets, pp 654-665.
22. Chabás A, Coll MJ, Pàmols T (1995) Malalties lisosòmiques. A: Del cromosoma al gen. Llibre commemoratiu dels 25 anys de l'Institut de Bioquímica Clínica. Corporació Sanitària 317-388.
23. de Duve C (1969) The lysosome in retrospect In: *Lysosomes in Biology and pathology*, Vol 1 (Dinge JT, Fell HB, eds.) North-Holland publishing Co, Amsterdam London, pp. 3-40.
24. Schnell AH, Borg LAH (1985) Lysosomes and pancreatic islet function. Glucose-dependent alterations of lysosomal morphology. *Cell Tissue Res* 239: 537-545.
25. Schnell AH, Swenne I, Borg LAH (1988) Lysosomes and pancreatic islet function. A quantitative estimation of crinophagy in the mouse pancreatic B-cell. *Cell Tissue Res* 252: 9-15.
26. Borg LAH, Schnell AH (1986) Lysosomes and pancreatic islet function: intracellular insulin degradation and lysosomal transformations. *Diabetes Res* 3: 277-285.
27. Landstrom AH, Westman J, Borg LA (1988) Lysosomes and pancreatic islet function. Time course of insulin biosynthesis, insulin secretion, and lysosomal transformation after rapid changes in glucose concentration. *Diabetes* 37: 309-316.
28. Landstrom Schnell A (1987) A role for crinophagy in pancreatic islet B-cell. *Upsala J Med Sci* 92: 99-113.
29. Opie EL (1901) On the ralation of chronic interstitial pancreatic to the islands of Langerhans and to diabetes mellitus. *J Exp Med* 5: 397-428.
30. Opie EL (1901) The relation of diabetes mellitus to lesions of the pancreas: hyaline degeneration of the islets of Langerhans. *J Exp Med* 5: 527-540.
31. Ehrlich JC, Rattner IM (1961) Amyloidosis of the islets of Langerhans. *Am J Pthol* 38: 49-51.
32. Wesermark P, Wernstedt C, Wilander E, Sletten K (1986) A novel peptide in the calcitonin gene-related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochem Biphys Res Commun* 140: 827-831.
33. Cooper GJS, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, Reid KB (1987) Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8628-8632.
34. Clark A (1992) Islet amyloid: an enigme of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Rev* 8: 117-132.

35. Glenner GG (1980) Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses. *N Engl J Med* 302: 1333-1343.
36. Serepell LC, Sunde M, Benson MD, Tennent GA, Pepys MB, Fraser PER (2000) The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J Mol Biol* 300: 1033-1039.
37. Glenner GG (1980) Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses. *N Engl J Med* 302: 1283-1292.
38. Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake C (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* 273: 729-739.
39. Hutchinson WL, Hohenester E, Pepys MB (2000) Human serum amyloid P component is a single uncomplexed pentamer in woe serum. *Mol Med* 6: 482-493.
40. Pepys MB, Booth DR, Hutchinson WL, Gallimore GR, Collins PM, Hohenester E (1997) Amyloid P component: a critical review. *Amyloid* 4: 274-295.
41. Botto M, Hawkins PN, Bickerstaff MC, Herbert J, Bygrave AE, McBride A, et al. (1997) Amyloid deposition is delayed in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene. *Nat Med* 3: 855-859.
42. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee (1993) Nomenclature of amyloid and amyloidosis. *Bull World Health Organ* 71: 105-112.
43. Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 885-890.
44. Khan SE, D'Alessio DA, Schwart MW, Fujimoto WY, Ensinck JW, Taborsky GJ, Porte D (1990) Evidence of cosecretion of islet amyloid polypeptide and insulin by beta-cells. *Diabetes* 39: 634-638.
45. Novials A, Sarri Y, Casamitjana R, Rivera F, Gomis R (1993) Regulation of islet amyloid polypeptide in human pancreatic islets. *Diabetes* 42: 1514-1519.
46. Westermark P, Engstrom U, Johnson KH, Westermark GT, Betsholtz C (1990) Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5036-5040.
47. Nishi M, Snake T, Senio S, Hedí RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB, Bell GI, Steiner DF (1989) Human islet amyloid polypeptide gene: complete nucleotide sequence, chromosomal localization, and evolutionary history. *Mol Endocrinol* 3: 1775-1781.
48. Sanke T, Bell GI, sample C, Rubentstein AH, Steiner DF (1988) An islet amyloid peptide is derived from a 89-amino acid precursor by proteolytic processing. *J Biol Chem* 263: 17243-17246.
49. Leffert JD, Newgard C, Okamoto H, Milburn JL, Luskey KL (1989) Rat amylin: cloning and tissue-specific expression in pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3127-3130.
50. Bailyes EM, Shennan KI, Seal AJ, Smeekens SP, Steiner DF, Hutton JC, et al. (1992) A member of the eukaryotic subtilisin family (PC3) has the enzymatic properties of the type 1 proinsulin-converting endopeptidase. *Biochem J* 285: 391-394.
51. Badman Mk, Shennan KI, Jermamy JL, Docherty K, Clark A (1996) Processing of pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) by the prohormone converatse PC2. *FEBS Lett* 378: 227-231.

52. Wang J, Xu J, Finnerty J, Furuta M, Steiner DF, Verchere CB (2001) The prohormone convertase enzyme 2 (PC2) is essential for processing pro-islet amyloid polypeptide at the NH₂-terminal cleavage site. *Diabetes* 50: 534-539.
53. Jaikaran ETAS, Clark A (2001) Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 1537: 179-203.
54. Koning EJ, Bodkin NL, Hansen BC, Clark A (1993) Diabetes mellitus in *Macaca mulatta* monkeys is characterised by islet amyloidosis and reduction in beta-cell population. *Diabetologia* 36: 378-384.
55. Jhonson KH, O'Brien TD, Betsholtz C, Westermark P (1989) Islet amyloid, islet-amyloid polypeptide, and diabetes mellitus. *New Engl J Med* 321: 513-518.
56. Moriarty DF, Raleigh DP (1999) Effects of sequential proline substitutions on amyloid formation by human amylin (20-29). *Biochemistry* 38: 1811-1818.
57. Ashburn TT, Auger M, Lansbury PT Jr (1992) The structural basis of pancreatic amyloid formation: isotope-edited spectroscopy in the solid state. *J Am Chem Soc* 114: 790-791.
58. Glenner GG, Eanes ED, Wiley CA (1988) Amyloid fibrils formed from a segment of the pancreatic-islet amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 155: 608-614.
59. Griffiths JM, Ashburn TT, Auger M, Costa PR, Griffin RG, Lansbury PT (1995) Rotational resonance solid-state NMR elucidates a structural model of pancreatic amyloid. *J Am Chem Soc* 117: 3539-3546.
60. Nilsson MR, Raleigh DP (1999) Analysis of amylin cleavage products provides new insights into the amyloidogenic region of human amylin. *J Mol Biol* 294: 1375-1385.
61. Jaikaran ETAS, Higham CE, Serpell LC, Zurdo J, Gross M, Clark A, Fraser PE (2001) Identification of a novel human islet amyloid polypeptide beta-sheet domain and factors influencing fibrillogenesis. *J Mol Biol* 308: 515-525.
62. Tenidis K, Walder M, Bernhager J, Fishle W, Bergmann M, Weber M et al (2000) Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) and with amyloidogenic and cytotoxic properties. *J Mol Biol* 295: 1055-1071.
63. Scrocchi LA, Chen Y, Waschuk S, Wang F, Cheung S, Darabie AA, McLaurin J, Frase PE (2002) Design of peptide-based inhibitors of human islet amyloid polypeptide fibrillogenesis. *J Mol Biol* 318: 697-706.
64. Scrocchi LA, Ha K, Chen Y, Wu L, Wang F, Frase PE (2003) Identification of minimal peptide sequences in the (8-20) domain of human islet amyloid polypeptide involved in fibrillogenesis. *J Struct Biol* 141: 218-227.
65. Semenkovich CF, Heinecke JW (1997) The mystery of diabetes and atherosclerosis. Time for a new plot. *Diabetes* 46:327-334.
66. Davignon J, Cohn JS, Mabille L, Bernier L (1999) Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clin Chim Acta* 286: 115-143.
67. Brewer HB Jr, Zech LA, Gregg RE, Schwartz D, Schaefer EJ (1983) Type III hyperlipoproteinemia: diagnosis, molecular defects, pathology, and treatment. *Ann Intern Med* 98: 623-640.
68. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J (1992) Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res* 33: 447-457.

69. Yamaguchi H, Ishiguro K, Sugihara S, Nakazato Y, Kawarabayashi T, Sun X, Hiari S (1994) Presence of apolipoprotein E on extracellular neurofibrillary tangles and on meningeal blood vessels precedes the Alzheimer beta-amyloid deposition. *Acta Neuropathol* 88: 413-419.
70. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, et al. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923.
71. Polvikoski T, Sulkava R, Haltia M, Kainulainen K, Vuorio A, Verkkoniemi A, Niinisto L, Halonen P, Kontula K (1995) Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid. *N Engl J Med* 333: 1242-1247.
72. Charge SB, Esiri MM, Bethune CA, Hansen BC, Clark A (1996) Apolipoprotein E is associated with islet amyloid and other amyloidoses: implications for Alzheimer's disease. *J Pathol* 179: 443-447.
73. Verchere CB, Andrikopoulos S, D'Alessio DA, O'Brien KD, Wight TN, Snow AD, Olin KL, Kahn SE (1998) Role of apolipoprotein E and perlecan in islet amyloid formation in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Diabetes* 47 (Suppl. 1): A30
74. Kahn SE, Andrikopoulos S, Verchere CB (1999) Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 241-253.
75. Basu SK, Ho YK, Brown MS, Bilheimer DW, Anderson RG, Goldstein JL (1982) Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J Biol Chem* 257: 9788-9795.
76. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW (1987) Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolise apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 917: 148-161.
77. Ma J, Yee A, Brewer HB, Das S, Potter H (1994) Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature* 372: 92-94.
78. Wisniewski T, Castaño EM, Golabek A, Vigel T, Frangione B (1994) Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol* 145: 1030-1035.
79. Sanan DA, Weisgraver KH, Russell SJ, Mahley RW, Huang D, Saunders A, et al. (1994) Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils: isoform E4 associates more efficiently than apoE3. *J Clin Invest* 94: 860-869.
80. Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altschiel L, Bender M, et al. (1997) Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet* 17: 263-264.
81. Powell DS, Maksoud H, Hattersley AT, Chargé SBP, Matthews DR, Levy JC, et al. (1999) Apolipoprotein E genotype is not associated with islet amyloid as assessed by disease severity in type 2 diabetes. *Diabetologia* 42: A146.
82. Vidal J, Verchere CB, Andrikopoulos S, Wang F, Hull RL, Cnop M, Olin KL, LeBoeuf RC, O'Brien KD, Chait A, Kahn SE (2003) The effect of apolipoprotein E deficiency on islet amyloid deposition in human islet amyloid polypeptides transgenic mice. *Diabetologia* 46: 71-79.
83. Iozzo RV, Cohen IR, Grassel S, Murdoch AD (1994) The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J*. 302: 625-639.

84. Young DI, Ailles L, Narindrasorasak S, Tan R, Kisilevsky R (1992) Localization of the basement membrane heparan sulfate proteoglycan in islet amyloid deposits in type II diabetes mellitus. *Arch Pathol Lab Med* 116:951-954.
85. Su JH, Cummings BJ, Cotman CW (1992) Localization of heparan sulfate glycosaminoglycans and proteoglycan core protein in aged brain and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 51: 801-813.
86. Snow AD, Sekiguchi R, Nochlin D, Fraser P, Kimata K, Mizutani A, Arai M, Schreier WA, Morgan DG (1994) An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain. *Neuron* 12: 219-34.
87. Gupta-Bansal R, Frederickson CA, Brunden KR (1995) Proteoglycan-mediated inhibition of A β proteolysis. *J Biol Chem* 270: 18666-18671.
88. McCubbin WD, Kay CM, Narindrasorasak S, Kisilevsky R (1988) Circular-dichroism studies on two murine serum amyloid A proteins. *Biochem J* 256: 775-783.
89. Kisilevsky R, Fraser PE (1997) A beta amyloidogenesis: unique, or variation on a systemic theme? *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32: 361-404.
90. Park K, Verchere B (2001) Identification of a heparin binding domain in the N-terminal cleavage site of pro-islet amyloid polypeptide. *J Biol Chem* 276: 16611-16616.
91. Bame KJ, Danda J, Hassall A, Tumova S (1997) A β (1-40) prevents heparanase-catalyzed degradation of heparan sulfate glycosaminoglycans and proteoglycans in vitro. A role for heparan sulfate proteoglycan turnover in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 272: 17005-17011.
92. Castillo GM, Cummings JA, Yang W, Judge ME, Sheardown MJ, Rimvall K, Hansen JB, Snow AD (1998) Sulfate content and specific glycosaminoglycan backbone of perlecan are critical for perlecan's enhancement of islet amyloid polypeptide (amylin) fibril formation. *Diabetes* 47: 612-620.
93. Potter-Perigo S, Hull RL, Tsoi C, Braun KR, Andrikopoulos S, Teague J, Bruce Verchere C, Kahn SE, Wight TN (2003) Proteoglycans synthesized and secreted by pancreatic islet beta-cells bind amylin. *Arch Biochem Biophys* 413: 182-190.
94. Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, Cooper GJ, Holman RR, Turner RC (1988) Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9: 151-159.
95. Westermark P, Grimelius L (1973) The pancreatic islet cells in insular amyloidosis in human diabetic and non-diabetic adults. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 81(3): 291-300.
96. Hoppener JW, Ahren B, Lips CJ (2000) Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 343: 411-418.
97. Couce M, Kane LA, O'Brien TD, Charlesworth J, Soeller W, McNeish J, Kreutter D, Roche P, Butler PC (1996) Treatment with growth hormone and dexamethasone in mice transgenic for human islet amyloid polypeptide causes islet amyloidosis and beta-cell dysfunction. *Diabetes* 45: 1094-1101.
98. Soeller WC, Janson J, Hart SE, Parker JC, Carty MD, Stevenson RW, Kreutter DK, Butler PC (1998) Islet amyloid-associated diabetes in obese A(vy)/a mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Diabetes* 47: 743-750.

99. Janson J, Butler P, Soeller W (1998) High islet amyloid polypeptide secretion results in transient hyperglycemia without beta-cell death. *Diabetes* 47: 116.
100. Hoppener JW, Oosterwijk C, Nieuwenhuis MG, Posthuma G, Thijssen JH, Vroom TM, Ahren B, Lips CJ (1999) Extensive islet amyloid formation is induced by development of Type II diabetes mellitus and contributes to its progression: pathogenesis of diabetes in a mouse model. *Diabetologia* 42: 427-434.
101. MacArthur DL, de Koning EJ, Verbeek JS, Morris JF, Clark A (1999) Amyloid fibril formation is progressive and correlates with beta-cell secretion in transgenic mouse isolated islets. *Diabetologia* 42: 1219-27.
102. Kayed R, Bernhagen J, Greenfield N, Sweimeh K, Brunner H, Voelter W, Kapurniotu A (1999) Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro. *J Mol Biol* 287: 781-796.
103. Rhoades E, Agarwal J, Gafni A (2000) Aggregation of an amyloidogenic fragment of human islet amyloid polypeptide. *Biochim Biophys Acta* 1476: 230-238.
104. Rhoades E, Gafni A (2003) Michelle formation by a fragment of human islet amyloid polypeptide. *Biphys J* 84: 3480-3487.
105. Nakazato M, Asai J, Kangawa K, Matsukura S, Matsuo H (1989) Establishment of radioimmunoassay for human islet amyloid polypeptide and its tissue content and plasma concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 394-9.
106. Yagui K, Yamaguchi T, Kanatsuka A, Shimada F, Huang CI, Tokuyama Y, Ohsawa H, Yamamura K, Miyazaki J, Mikata A, et al. (1995) Formation of islet amyloid fibrils in beta-secretory granules of transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide/amylin. *Eur J Endocrinol* 132: 487-496.
107. O'Brien TD, Butler AE, Roche PC, Johnson KH, Butler PC (1994) Islet amyloid polypeptide in human insulinomas. Evidence for intracellular amyloidogenesis. *Diabetes* 43: 329-336.
108. de Koning EJ, Morris ER, Hofhuis FM, Posthuma G, Hoppener JW, Morris JF, Capel PJ, Clark A, Verbeek JS (1994) Intra- and extracellular amyloid fibrils are formed in cultured pancreatic islets of transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8467-8471.
109. Westermark G, Arora MB, Fox N, Carroll R, Chan SJ, Westermark P, Steiner DF (1995) Amyloid formation in response to beta cell stress occurs in vitro, but not in vivo, in islets of transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Mol Med* 1: 542-53.
110. Sakagashira S, Sanke T, Hanabusa T, Shimomura H, Ohagi S, Kumagaye KY, Nakajima K, Nanjo K (1996) Missense mutation of amylin gene (S20G) in Japanese NIDDM patients. *Diabetes* 45: 1279-1281.
111. Hiddinga HJ, Eberhardt NL (1999) Intracellular amyloidogenesis by human islet amyloid polypeptide induces apoptosis in COS-1 cells. *Am J Pathol* 154: 1077-1088.
112. Badman MK, Shennan KI, Jermamy JL, Docherty K, Clark A (1996) Processing of pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) by the prohormone convertase PC2. *FEBS Lett* 378: 227-231.
113. Clark A, Edwards CA, Ostle LR, Sutton R, Rothbard JB, Morris JF, Turner RC (1989) Localisation of islet amyloid peptide in lipofuscin bodies and secretory granules of human B-cells and in islets of type-2 diabetic subjects. *Cell Tissue Res* 257: 179-185.

114. Schnell AH, Swenne I, Borg LA (1988) Lysosomes and pancreatic islet function. A quantitative estimation of crinophagy in the mouse pancreatic B-cell. *Cell Tissue Res.* 252: 9-15.
115. Verchere CB, D'Alessio DA, Palmiter RD, Weir GC, Bonner-Weir S, Baskin DG, Kahn SE (1996) Islet amyloid formation associated with hyperglycemia in transgenic mice with pancreatic beta cell expression of human islet amyloid polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3492-3496.
116. Hull RL, Andrikopoulos S, Verchere CB, Vidal J, Wang F, Cnop M, Prigeon RL, Kahn SE (2003) Increased dietary fat promotes islet amyloid formation and beta-cell secretory dysfunction in a transgenic mouse model of islet amyloid. *Diabetes* 52: 372-379.
117. Novials A, Rojas I, Franco C, Casamitjana R, Usac EF, Gomis R (2001) A novel mutation in islet amyloid polypeptide (IAPP) gene promoter is associated with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 4: 1064-1065.
118. Rojas I, Gomis R, Casals E, Quinto LI, Franco C, Novials A (2002) Polymorphism in intron 2 of islet amyloid polypeptide gene is associated with lower low-density lipoprotein cholesterol in nondiabetic subjects and in type 2 diabetic patients. *Endocrine* 19: 185-189.
119. Nishi M, Bell GI, Steiner DF (1990) Islet amyloid polypeptide (amylin): no evidence of an abnormal precursor sequence in 25 type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 33: 628-630.
120. Marzban L, Park K, Verchere CB (2003) Islet amyloid polypeptide and type 2 diabetes. *Exp Gerontol* 38: 347-351.
121. Higham CE, Hull RL, Lawrie L, Shennan KIJ, Morris JF, Brich Np, Docherty K, Clark A (2000) Processing of synthetic pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) "amylin" by recombinant prohormone convertase enzymes, PC2 and PC3, in vitro. *Eur J Biochem* 267: 4998-5004.
122. Hutton JC (1994) Insulin secretory granule biogenesis and the proinsulin-processing endopeptidases. *Diabetologia* 37 (Suppl. 2) S48-S56.
123. Wang J, Xu J, Finnerty J, Furuta M, Steiner DF, Verchere CB (2001) The prohormone convertase enzyme 2 (PC2) is essential for processing pro-islet amyloid polypeptide at the NH2-terminal cleavage site. *Diabetes* 50: 534-539.
124. Hou X, Ling Z, Quartier E, Foriers F, Shuit F, Pipeleers D, Van Schravendijk C (1999) prolonged exposure of pancreatic beta cells to raised glucose concentrations results in increased cellular content of islet amyloid polypeptide precursors. *Diabetologia* 42: 188-194.
125. Furukawa H, Carroll RJ, Swift HH, Steiner DF (1999) Long-term elevation of free fatty acids leads to delayed processing of proinsulin and prohormone convertases 2 and 3 in the pancreatic beta-cell line MIN6. *Diabetes* 48: 1395-1401.
126. Westermark P, Engström U, Westermark GT, Johnson KH, Permerth J, Betsholtz C (1989) Islet amyloid polypeptide (IAPP) and pro-IAPP immunoreactivity in human islets of Langerhans. *Diabetes Res Clin Pract* 7: 219-226.
127. Clark A, de Koning EJP, Baker CA, Charge S, Morris JF (1993) Localisation of N-terminal pro-islet amyloid polypeptide in beta cells of man and transgenic mice. *Diabetologia* 36 A136.
128. Westermark P (1972) Quantitative studies on amyloid in the islets of Langerhans. *Ups J Med Sci* 77: 91-94.

129. Clark A, Saad MF, Nezzet T, Uren C, Knowler WC, Bennett PH, Turner RC (1990) Islet amyloid polypeptide in diabetic and non-diabetic Pima Indians. *Diabetologia* 33: 285-289.
130. Westermark P (1994) Amyloid and polypeptide hormones: what is their relationship? *Amyloid Int J Exp Clin Invest* 1: 47-60.
131. Steiner DF, Ohagi S, Nagamatsu S, Bell GI, Nishi M (1991) Is islet amyloid polypeptide a significant factor in pathogenesis or pathophysiology of diabetes?. *Diabetes* 40: 305-309.
132. Davidson MB (1979) The effect of aging on carbohydrate metabolism: a review of the English literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly. *Metabolism* 28: 687-705.
133. Bowen-Jones D, Gill GV (1997) Non-insulin dependent diabetes mellitus, in: J Pickup, G Williams (Eds.), *Textbook of Diabetes*, Blackwell Science, Oxford, pp. 17.1-17.13.
134. Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Engelgau MM, Rios N, Burrows LS, Geiss R, Valdez R, et al. (2000) Type 2 diabetes among north american children and adolescents: an epidemiological review and a public health perspective. *J Pediatr* 136: 664-672.
135. Ferranini E (1998) Insulin resistance versus insulin deficiency in non-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev* 19: 477-490.
136. Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, et al. (1988) Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9: 151-159.
137. Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC, Yanker BA (1994) Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* 368: 756-760.
138. Tenidis K, Waldner M, Bernhagen J, Fischle W, Bergmann M, Weber M, Merkle ML, Voelter W, Brunner H, Kapurniotu A (2000) Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties. *J Mol Biol* 295: 1055-1071.
139. Mirzabekov TA, Lin MC, Kagan BL (1996) Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin. *J Biol Chem* 271: 1988-1992.
140. Anguiano M, Nowak RJ, Lansbury PT Jr (2002) Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. *Biochemistry* 41: 11338-11343.
141. Paulsson M, Yurchenco PD, Ruben GC, Engel J, Timpl R (1987) Structure of low density heparan sulfate proteoglycan isolated from a mouse tumor basement membrane. *J Mol Biol* 197:297-313.
142. Laurie GW, Inoue S, Bing JT, Hassell JR. (1988) Visualization of the large heparan sulfate proteoglycan from basement membrane. *Am J Anat* 181:320-326.
143. Dodge GR, Kovalszky I, Chu ML, Hassell JR, McBride OW, Yi HF, Iozzo RV. (1991) Heparan sulfate proteoglycan of human colon: partial molecular cloning, cellular expression, and mapping of the gene (HSPG2) to the short arm of human chromosome 1. *Genomics* 10:673-680.
144. Iozzo RV, Pillarisetti J, Sharma B, Murdoch AD, Danielson KG, Uitto J, Mauviel A. (1997) Structural and functional characterization of the human perlecan gene promoter. *J Biol Chem* 272:5219-5228.

145. Cohen IR, Grässel S, Murdoch AD, Iozzo RV. (1993) Structural characterization of the complete human perlecan gene and its promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10404-10408
146. Iozzo RV, Murdoch AD. (1996) Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J* 10:598-614.
147. Murdoch AD, Dodge GR, Cohen I, Tuan RS, Iozzo RV. (1992) Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/Perlecan). *J Biol Chem* 267:8544-8557.
148. Murdoch AD, Iozzo RV. (1993) Perlecan: the multidomain heparan sulphate proteoglycan of basement membrane and extracellular matrix. *Virchows Archiv A* 423:237-242.
149. Noonan DM, Fulle A, Valente P, Cai S, Horigan E, Sasaki M, Yamada Y, Hassell JR (1991) The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A-chain, low density lipoprotein-receptor and the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 266:22930-22947.
150. Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. (1985) The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 228:815-22.
151. Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell DW. (1984) The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39:27-38.
152. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. (1987) Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236:799-806.
153. Tapanadechopone P, Hassell JR, Rigatti B, Couchman JR. (1999) Localization of glycosaminoglycan substitution sites on domain V of mouse perlecan. *Biochem Biophys Res Commun* 265:680-690.
154. Aviezer D, Hecht D, Safran M, Eisinger M, David G, Yayon A (1994) Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell* 79: 1005-1013.
155. Hassell JR, Robey PG, Barrach HH, Wilczek J, Rennant SI, Martin GR. (1980) Isolation of a heparan-sulfate-containing proteoglycans from basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4494-4498.
156. Dziadek M, Paulsson M, Timpl R. (1985) Identification and interaction repertoire of large forms of the basement membrane protein nidogen. *EMBO J* 4:2513-2518.
157. Carson DD, Tang JP, Julian J. (1993) Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. *Dev Biol* 155:97-106.
158. Handler M, Yurchenco PD, Iozzo RV. (1997) Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis. *Dev Dyn* 210:130-145.
159. Rogalski TM, Williams BD, Mullen GP, Moerman DG (1993) Products of the *unc-52* gene in *Caenorhabditis elegans* are homologous to the core protein of the mammalian basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *Genes Dev* 7: 1471-1484.

160. Costell M, Gustafsson E, Aszódi A, Mörgelin M, Bloch W, Hunziker E, Addicks K, Timpl R, Fässler R (1999) Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol* 147: 1109-1122.
161. Iozzo RV. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67:609-652.
162. Watkins DT, Cooperstein SJ. (1987) Synthesis of glycosaminoglycans by islets of Langerhans. *Life Science* 42:431-435.
163. Rohrbach DH, Hassell JR, Kleinman HK, Martin GR. (1982) Alterations in the basement membrane (heparan sulfate) proteoglycan in diabetic mice. *Diabetes* 31:185-188.
164. Unger E, Pettersson I, Eriksson UJ, Lindahl U, Kjellen I. (1991) Decreased activity of the heparan sulfate modifying enzyme glucosaminyl N-desacetylase in hepatocytes from streptozotocin diabetic rats. *J Biol Chem* 266:8671-8674.
165. Ebara T, Conde K, Kako Y, Liu Y, Xu Y, Ramakrishnan R, Goldberg IJ, Shachter NS. (2000) Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice. *J Clin Invest* 105:1807-1818.
166. Deckert T, Horowitz IM, Kofoed-Enevoldsen A, Kjellén L, Deckert M, Lykkelund C, Burchardt F. (1991) Possible genetic defects in regulation of glycosaminoglycans in patients with diabetic nephropathy. *Diabetes* 40:764-70.
167. Kasinath BS, Grellier P, Choudhury GG, Abboud SL. (1996) regulation of basement membrane heparan sulfate proteoglycan, perlecan, gene expression in glomerular epithelial cells by high glucose medium. *J Cell Physiol* 167:131-136.
168. Morano S, Guidobaldi L, Cipriani R, Gabriele A, Pantellini F, Medici F, D'Erme M, Di Mario U. (1999) High glucose modifies heparansulphate synthesis by mouse glomerular epithelial cells. *Diabetes Metab Res Rev* 15:13-20.
169. Templeton D, Fan MY. (1996) Posttranscriptional effects of glucose on proteoglycan expression in mesangial cells. *Metabolism* 45:1136-1146.
170. Parthasarathy N, Gotow LF, Bottoms JD, Obunike JC, Naggi A, Casu B, Goldberg IJ, Wagner WD. (2000) Influence of glucose on production and N-sulfation of heparan sulfate in cultured adipocyte cells. *Mol Cell Biochem* 213:1-9.
171. Henning B, Lipke DW, Biossonneault GA, Ramasamy S. (1995) Role of fatty acids and eicosanoids in modulating proteoglycan metabolism in endothelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 53:315-324.
172. Camejo G, Hurt-Camejo E, Olsson U, Bondjers G. (1999) Lipid mediators that modulate the extracellular matrix structure and function in vascular cells. *Curr Atheroscler Rep* 1:142-149.
173. Olsson U, Bondjers G, Camejo G. (1999) Fatty acids modulate the composition of extracellular matrix in cultures human arterial smooth muscle cells by altering the expression of genes for proteoglycan core proteins. *Diabetes* 48:616-622.
174. Mahadevan R, Larkins RG, Fraser JRE, Fosang AJ, Dunlop ME. (1995) Increased hyaluronan production in the glomeruli from diabetic rats: a link between glucose-induced prostaglandin production and reduced sulphated proteoglycan. *Diabetologia* 38:298-305.
175. Ko CW, Bhandari B, Yee J, Terhune WC, Maldonado R, Kasinath BS. (1996) Cyclic AMP regulates basement membrane heparan sulfate proteoglycan, perlecan, metabolism in rat glomerular epithelial cells. *Mol Cell Biochem* 162:65-73.

176. Conde-Knape K. (2001) Heparan sulfate proteoglycans in experimental models of diabetes: a role for perlecan in diabetes complications. *Diabetes/Metab Res Rev* 17:412-421.
177. Falk RJ, Scheinman SM, Maser JE, Michael AF. (1983) Polyantigenic expansion of basement membrane constituents in diabetic nephropathy. *Diabetes* 32(Suppl. 2):34-39.
178. Jensen T. (1997) Pathogenesis of diabetic vascular disease: evidence for the role of reduced heparan sulfate proteoglycan. *Diabetes* 46:S98-S100.
179. Ledbetter S, Jill Copeland E, Noonan D, Vogeli G, Hassell JR. (1990) Altered steady-state mRNA levels of basement membrane proteins in diabetic mouse kidneys and thromboxane synthase inhibition. *Diabetes* 39:196-203.
180. Bollinene JS, Alluru I, Reddi AS. (1997) Heparan sulfate proteoglycan synthesis and its expression are decreased in the retina of diabetic rats. *Curr Eye Res* 16:17-130.
181. Spiro MJ. (1987) Sulfate metabolism in the alloxan-diabetic rat: relationship of altered sulfate pools to proteoglycan sulfation in heart and other tissues. *Diabetologia* 30:259-267.
182. Kjellen L, Bielefeld D, Hook M. (1983) Reduced sulfation of liver heparan sulfate in experimentally diabetic rats. *Diabetes* 32:337-342.
183. Klein DJ, Cohen RM, Rimaszewski Z. (1995) Proteoglycan synthesis by bovine myocardial endothelial cells is increased by long-term exposure to high concentrations of glucose. *J Cell Physiol* 165:493-502.
184. Al-Haideri M, Goldberg IJ, Galeano NF (1997) Heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of lipoprotein E-triglyceride rich lipoprotein particles: a major pathway at physiological particle concentrations. *Biochemistry* 36:12766-12772.
185. Yu KCW, Chen W, Cooper AD (2001) LDL receptor-related protein mediates cell-surface clustering and hepatic sequestration of chylomicron remnants in LDLR-deficient mice. *J Clin Invest* 107:1387-1394.
186. Fuki IV, Blanchard N, Jin W, Marchadier DHL, Millar JS, Glick JM, Rader DJ (2003) Endogenously produced endothelial lipase enhances binding and cellular processing of plasma lipoproteins via HSPG-mediated pathway. *J Biol Chem papers in press (M302181200)*.
187. Laaffont I, Shuvaev VV, Briand O, Lestavel S, Barbier A, Taniguchi N, Fruchart J, Clavey V, Siest G (2002) early-glycation of apolipoprotein E: effect on its binding to LDL receptor, scavenger receptor A and heparan sulfates. *Biochim et Biophys Acta* 1583: 99-107.
188. Sasake A, Goldberg IJ (1992) Lipoprotein lipase release from BFC-1 beta adipocytes. Effects of triglyceride-rich lipoproteins and lipolysis products. *J Biol Chem* 267:15198-15204.
189. Inove S, Kuroiwa M, Saraiva MJ, Guimaraes A, Kisilevsky R (1998) Ultrastructure of familial amyloid polyneuropathy amyloid fibrils: examination with high resolution electron microscopy. *J Struct Biol* 124: 1-12.
190. Snow AD, Wight TN (1989) Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses. *Neurobiol Aging* 10: 481-497.
191. Snow AD, Mar H, Nochilin D, et al (1990) Early accumulation of heparan sulfate in neurons and in the beta-amyloid protein-containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Am J Pathol* 137: 1253-1270.

192. Perlmutter L, Chui H, Saperia D, Athanikar J (1990) Microangiopathy and the colocalization of heparan sulfate proteoglycan with amyloid in senile plaques of Alzheimer's disease. *Brain Res* 508: 13-19.
193. Snow AD, Wight TN, Nochilin D, Koike Y, Kimata K, DeArmond SJ, Prusiner SB (1990) Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Lab Invest* 63: 601-611.
194. Snow AD, Bramson R, Mar H, Wight TN, Kisilevsky R (1991) A temporal and ultrastructural relationship between heparan sulfate proteoglycans and AA amyloid in experimental amyloidosis. *J Histochem Cytochem* 39: 1321-1330.
195. Snow AD, Kinsella MG, Prather PB, et al (1989) A characteristic binding affinity between heparan sulfate proteoglycans and the A4 amyloid protein of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 48: 352.
196. Narindrasorasak S, Lowery D, Gonzalez-DeWhitt P, Poorman RA, Greenberg B, Kisilevsky R (1991) High affinity interactions between the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein and the basement membrane form of heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 266: 12878-12883.
197. Snow AD, Cummings JA, Ngo CT, Yang W, Nochilin D, Rimvall K, Sheardown MJ, Judge M (1995) Further studies implicating the importance of perlecan (a specific heparan sulfate proteoglycan) in an animal model of fibrillar A β amyloid deposition in vivo: comparison of A β (1-42) versus A β (1-40). *Soc Neurosci Abstr* 21: 1282.
198. Bame KJ, Danda J, Hassall A, Tumova S (1997) A β (1-40) prevents heparanase-catalyzed degradation of heparan sulfate glycosaminoglycan and proteoglycans in vitro. A role for heparan sulfate proteoglycan turnover in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 272: 17005-17011.
199. Castillo GM, Ngo C, Cummings J, Wight TN, Snow AD (1997) Perlecan binds to the beta amyloid proteins AB of Alzheimer's disease, accelerates AB fibril formation, and maintains AB fibril stability. *J Neurochem* 69: 2452-2465 P65.
200. Snow AD, Kinsella MG, Parks E, et al (1995) Differential binding of vascular cell-derived proteoglycans (perlecan, biglycan, decorin, and versican) to the beta-amyloid protein Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 320: 84-95.
201. Castillo GM, Lukito W, Wight TN, Snow AD (1999) The sulfate moieties of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of β -amyloid protein fibril formation. *J Neurochemistry* 72: 1681-1687.
202. Watson DJ, Lander AD, Selkoe DJ (1997) Heparin-binding properties of the amyloidogenic peptides A β and amylin. *J Biol Chem* 272: 31617-31624.
203. Hart M, Li L, Tokunaga T, Lindsey JR, Hassell JR, Snow AD, Fukuchi K (2001) Overproduction of perlecan core protein in cultured cells and transgenic mice. *J Pathol* 194: 262-269.
204. Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam study. *Neurology* 53: 1937-1942.
205. Heitner J, Dickson D (1997) Diabetes do not have increased Alzheimer-type pathology compared with age-matched control subjects. A retrospective postmortem immunocytochemical and histofluorescent study. *Neurology* 49: 1306-1311.
206. Curb JD, Rodriguez BL, Abbott RD, et al (1999) Longitudinal association of vascular and Alzheimer's dementia with diabetes, and glucose tolerance. *Neurology* 52: 971-975.

207. Hopwood JJ. (1989) Enzymes that degrade heparin and heparan sulphate. In heparin : chemical and biological properties, clinical applications. (Lane DW and Lindahl U, Eds.) Edward Arnold, London. 190-229.
208. Wilson PJ, Meaney CA, Hopwood JJ, Morris CP. (1993) Sequence of the human iduronate-2-sulfatase (IDS) gene. *Genomics* 17:773-775.
209. Flomen RH, Green PM, Bentley DR, Giannell F. (1993) Determination of the organization of coding sequences within the iduronate sulfatase (IDS) gene. *Human Mol Genet* 2:5-10.
210. Wilson PJ, Suthers GK, Callen DF, Baker E, Nelson PV, Cooper A, Wraith JE, Sutherland GR, Morris CP, Hopwood JJ. (1991) Frequent deletion in Xq28 indicate genetic heterogeneity in Hunter syndrome. *Hum Genet* 86:505-508.
211. Wilson PJ, Morris CP, Anson DS, Occhodoro T, Bielicki J, Clements PR, Hopwood JJ. (1990) Hunter syndrome: isolation of an iduronate-2-sulfatase cDNA clone and analysis of patient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8531-8535.
212. Bondeson ML, Malmgren H, Dahl N, Carlberg BM, Pettersson U. (1995) Presence of an IDS-related locus (IDS2) in Xq28 complicates the mutational analysis of Hunter syndrome. *Eur J Hum Genet* 3:219-227.
213. Hopwood JJ, Bunge S, Morris CP, Wilson PJ, Steglich C, Schwinger E, Gal A. (1993) Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: Mutations in the iduronate-2-sulphatase gene. *Hum Mutat* 2:435-442.
214. Rathmann M, Bunge S, Steglich C, Schwinger E, Gal A. (1995) Evidence for an iduronate-sulfatase pseudogene near the functional Hunter syndrome gene in Xq27.3-q28. *Hum Genet* 95:34-38.
215. Timms KM, Lu F, Shen Y, Pierson CA, Muzny DM, Gu Y, Nelson DL, Gibbs RA. (1995) 130 kb of DNA sequence reveals two new genes and a regional duplication distal to the human iduronate-2-sulfate sulfatase locus. *Genome Res* 5:71-78.
216. Daniele A, Faust CJ, Herman GE, Di Natale P, Ballabio A. (1993) Cloning and characterization of the cDNA for the murine iduronate sulfatase gene. *Genomics* 16:755-757.
217. Faust CJ, Verkerek AJMH, Wilson PJ, Morris CP, Hopwood JJ, Oostra BA, Herman GE. (1992). Genetic mapping on the mouse X chromosome of human cDNA clones for the fragile X and Hunter syndromes. *Genomics* 12:814-817.
218. Daniele A, Russo T, Ballabio A, Di Natale P. (1993) The mouse iduronate sulfatase gene: identification of a novel transcript. *Biochem Biophys Res Commun* 194(3):1030-1037.
219. Malmgren H, Carlberg B, Pettersson U, Bondeson M. (1995) Identification of an alternative transcript from the human iduronate-2-sulfatase (IDS) gene. *Genomics* 29: 291-293.
220. Cudry S, Froissart R, Bouton O, Marie I, Bozon D. (1999) The 2.1-, 5.4- and 5.7-kb transcripts of the IDS gene are generated by different polyadenylation signals. *Biochimica et Biophysica Acta* 1447:35-42.
221. Froissart R, Millart G, Mathieu M, Bozon D, Marie I. (1995) Processing of iduronate-2-sulfatase in human fibroblast. *Biochem J* 309:425-430.
222. Millart G, Froissart R, Maire I, Bozon D. (1997) IDS transfer from overexpressing cells to IDS-deficient cells. *Exp Cell Res* 230:362-367.

223. Kornfeld S, Mellan I. (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Biol* 5:483-525.
224. Wasteson A, Neufels EF (1982) Iduronate sulfatase from human plasma. *Methods Enzymol* 83:573.
225. Di Natale P, Daniele A. (1985) Iduronate sulfatase from human placenta. *Biochim Biophys Acta* 839:258.
226. Archer IM, Harper PS, Wusteman FS. (1982) Multiple forms of iduronate 2-sulphate sulphatase in human tissues and body fluids. *Biochim Biophys Acta* 708:134-140.
227. Lissens W, Zenati A, Liebaers I. (1984) Polyclonal antibodies against iduronate 2-sulphate sulphatase from human urine. *Biochim Biophys Acta* 801:365-371.
228. Bielicki J, Freeman C, Clements PR, Hopwood JJ. (1990) Human liver iduronate-2-sulphatase. *Biochem J* 271:75-86.
229. Hunter C. (1917) A rare disease in two brothers. *Proc R Soc Med* 10:104-116.
230. Bach G, Eisenberg F, Cantz M, Neufeld EF (1973) The defect in the Hunter syndrome: Deficiency of sulfoiduronate sulfatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:2134-2138.
231. Sjöberg I, Fransson LA, Matalon R, Dorfman A. (1973) Hunter's síndrome: A deficiency of L-idurono-sulfate sulfatase. *Biochem Biophys res Commun* 54:1125-1132.
232. Young ID, Harper PS. (1983) The natural history of the severe form of Hunter syndrome: A study based on 52 cases. *Dev Med Child Neurol* 25:48.
233. Young ID, Harper PS. (1982) Mild form of Hunter's syndrome: Clinical deletion based on 31 cases. *Arch Dis Child* 57:828.
234. Rathmann M, Bunge S, Beck M, Kresse H, Tytki-Szymanska A, Gal A. (1996) Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): Mutation "Hot Spots" in the Iduronate-2-sulfatase gene. *Am J Hum Genet* 59: 1202-1209.
235. Braun SE, Aronovich EL, Anderson RA, Crotty PL, McIvor RS, Whitley CB (1993) Metabolic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) by retroviral-mediated gene transfer and expression of human iduronate-2-sulfatase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 11830-4.
236. Whitley CB, McIvor RS, Aronovich EL, Berry SA, Blazar BR, Burger SR, et al. (1996) Retroviral-mediated transfer of the iduronate-2-sulfatase gene into lymphocytes for treatment of mild Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II). *Hum Gene Ther* 7: 537-549.
237. Braun SE, Pan D, Aronovich EL, Jonsson JJ, McIvor RS, Whitley CB (1996) Preclinical studies of lymphocyte gene therapy for mild Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II). *Hum Gene Ther* 7: 283-290.
238. Di Francesco C, Cracco C, Tomanin R, Picci L, Ventura L, Zacchello E, et al. (1997) In vitro correction of iduronate-2-sulfatase deficiency by adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 4: 442-448.
239. Kim SH, Yu SS, Park JS, Robbins PD, An CS, Kim S (1998) Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility. *J Virol* 1998 72: 994-1004.
240. Yu SS, Kim JM, Kim S (2000) High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. *Gene Ther* 7: 797-804.

241. Hong Y, Yu SS, Kim JM, Lee K, Na YS, Whitley CB, Sugimoto Y, Kim S (2003) Construction of a high efficiency retroviral vector for gene therapy of Hunter's syndrome. *J Gene Med* 5: 18-29.
242. Di Natale P, Di Domenico C, Villani GR, Lombardo A, Follenzi A, Naldini L (2002) In vitro gene therapy of mucopolysaccharidosis type I by lentiviral vectors. *Eur J Biochem* 269: 2764-2771.
243. Wilkerson MJ, Lewis DC, Marks SL, Prieur DJ (1998) Clinical and morphologic features of mucopolysaccharidosis type II in a dog: naturally occurring model of Hunter syndrome. *Vet Pathol* 35: 230-233.
244. Muenzer J, Lamsa JC, Garcia A, Dacosta J, Garcia J, Treco DA (2002) Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a preliminary report. *Acta Paediatr Suppl* 439: 98-99.
245. Ferrer J, Wasson J, Schoor K, Muecker M, Donis-Keller H, Permutt A (1997) Mapping Novel Pancreatic Islet Genes to human chromosomes. *Diabetes* 46: 386-392.
246. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 18 (24):5294-9.
247. Gluzman Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23:175-182.
248. Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, Oka Y, Yamamura K. (1990) Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127:126-132.
249. Powers AC, Efrat S, Mojsov S, Spector D, Habener JF, Hanahan D. (1990) Proglucagon processing similar to normal islets in pancreatic alpha-like cell line derived from transgenic mouse tumor. *Diabetes* 39:406-414.
250. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8392-8396.
251. Scheele G, Jacoby R (1983) Proteolytic processing of presecretory proteins is required for development of biological activities in pancreatic exocrine proteins. *J Biol Chem* 258:2005-2009.
252. Gittes GK, Rutter WJ (1992) Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1128-1132.
253. Frigerio JM, Dagorn JC, Iovanna JL (1995) Cloning, sequencing and expression of the L5, L21, L27a, L28, S5, S9, S10 and S29 human ribosomal protein mRNAs. *Biochim Biophys Acta* 1262: 64-68.
254. Daniele A, Tomanin R, Villani GRD, Zacchello F, Scarpa M, Di Natale P (2002) Uptake of recombinant iduronate-2-sulfatase into neuronal and glial cells in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1588: 203-209.
255. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
256. Tannahill D, Bray S, Harris WA (1995) A Drosophila E(spl) gene is "neurogenic" in Xenopus: a green fluorescent protein study. *Dev Biol* 168: 694-697.

257. Wang S, Hazelrigg T (1994) Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369: 400-403.
258. Gerdes HH, Kaether C (1999) Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett* 389:44-47.
259. Prasher DC (1995) Using GFP to see the light. *Trends Genet* 11: 320-323.
260. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233.
261. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173(1 Spec No): 33-38.
262. Fabregat ME, Usac EF, Franco C, Enrich C, Malaisse WJ, Gomis R (1998) Site-directed mutations of the FAD-linked glycerophosphate dehydrogenase gene impairs the mitochondrial anchoring of the enzyme in transfected COS-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 173-177.
263. Atouf F, Czernichow P, Scharfmann R (1997) Expression of neuronal traits in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 272: 1929-1934.
264. Hammonds P, Schoffield PN, Ashcroft SJH, Sutton R, Gray DWR (1987) Regulation and specificity of glucose-stimulated insulin gene expression in human islets of Langerhans. *FEBS Lett* 233: 131-137.
265. Welsh M, Nielsen DA, MacKrell AJ, Steiner DF (1985) Control of gene expression in pancreatic β -cells and in an insulin-producing cell line RIN 5F cells. *J Biol Chem* 260: 13590-13594.
266. Nielsen DA, Welsh M, Casadaban MJ, Steiner DF (1985) Control of gene expression in pancreatic β -cells and in an insulin-producing cell line RIN 5F cells. *J Biol Chem* 260: 13585-13589.
267. Johnson MR, Wang K, Smith JB, Heslin MJ, Diasio RB (2000) Quantitation of Dihydropyrimidine Dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 278:175-184.
268. Heid CA, Steven J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994.
269. Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Molec Endocrin* 25: 169-193.
270. Tournu C, Obled A, Roux MP, Ferrara M, Omura S, Bechet DM (2001) Glucose regulates protein catabolism in ras-transformed fibroblasts through a lysosomal-dependent proteolytic pathway. *Biochem J* 357: 255-261.
271. Matschinsky FM (1990) Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39: 647-652.
272. Brawerman G (1989) mRNA decay: finding the right targets. *Cell* 57: 9-10.
273. Marie S, Díaz-Guerra MJM, Miquerol L, Kahn A, Iynedjian PB (1993) The pyruvate kinase gene as a model for studies of glucose-dependent regulation of gene expression in the endocrine pancreatic β -cell-type. *J Biol Chem* 268: 23881-23890.
274. Foufelle F, Gouhot B, Pegorier JP, Perdureau D, Girard J, Ferre P (1992) Glucose stimulation of lipogenic enzyme gene expression in cultured white adipose tissue. *J Biol Chem* 267: 20543-20546.

275. Gasa R, Gomis R, Casamitjana R, Rivera F, Novials A (1997) Glucose regulation of islet amyloid polypeptide gene expression in rat pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 272:E543-E549.
276. Ding W, Holicky E, Miller LJ (2001) Glucose and forskolin regulate IAPP gene expression through different signal transduction pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E938-945.
277. Mulder H, Ahrén B, Sundler F (1996) Islet amyloid polypeptide and insulin gene expression are regulated in parallel by glucose in vivo rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 271: E1008-E1014.
278. Nagamatsu S, Nishi M, Steiner DF (1991) Biosynthesis of islet amyloid polypeptide. Elevated expression in mouse beta TC3 cells. *J Biol Chem* 266: 13737-13741.
279. Mulder H, Ahrén B, Sundler F (1996) Islet amyloid polypeptide (amylin) and insulin are differentially expressed in chronic diabetes induced by streptozotocin in rats. *Diabetologia* 39: 649-657.
280. Gasa R, Gomis R, Casamitjana R, Novials A (1997) Signals related to glucose metabolism regulate islet amyloid polypeptide (IAPP) gene expression in human pancreatic islets. *Regul Pept* 68: 99-104.
281. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. (1996) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci. USA* 93:11382-11388.
282. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.
283. Buchsacher GL, Wong-Staal F. (2000) Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 95: 2499-2504.
284. Dupraz P, Rinsch C, Pralong WF, Rolland E, Zufferey R, Trono D, Thorens B (1999) Lentivirus-mediated Bcl-2 expression in β TC-tet cells improves resistance to hypoxia and cytokine-induced apoptosis while preserving in vitro and in vivo control of insulin secretion. *Gene Therapy* 6: 1160-1169.
285. Laemmli UK. (1979) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
286. Kyhse-Anderson J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10:203.
287. Naldini L, Verma IM (2000) Lentiviral vectors. *Adv Virus Res* 55: 599-609.
288. Negre D, Mangeot PE, Duisit G, Blanchard S, Vidalain PO, Leissner P, et al. (2000) Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther* 7: 1613-1623.
289. Johnson LG, Olsen JC, Naldini L, Boucher RC (2000) Pseudotyped human lentiviral vector-mediated gene transfer to airway epithelia in vivo. *Gene Ther* 7: 568-574.
290. Richter J, Karlsson S (2001) Clinical gene therapy in hematology: past and future. *Int J Hematol* 73: 162-169.

291. Pfeifer A, Kessler T, Yang M, Baranov E, Kootstra N, Cheresch DA, Hoffman RM, Verma IM (2000) Transduction of liver cells by lentiviral vectors: analysis in living animals by fluorescence imaging. *Mol Ther* 3: 319-322.
292. Giannoukakis N, Mi Z, Gambotto A, Eramo A, Ricordi C, Trucco M, Robbins P (1999) Infection of intact human islets by a lentiviral vector. *Gene Ther* 6: 1545-1551.
293. Consiglio A, Quattrini A, Martino S, Bensadoun JC, Dolcetta D, Trojani A, et al. (2001) In vivo gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction of neuropathology and protection against learning impairments in affected mice. *Nat Med* 7: 310-316.
294. Bosch A, Perret E, Desmaris N, Trono D, Heard JM (2000) Reversal of pathology in the entire brain of mucopolysaccharidosis type VII mice after lentivirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 11: 1139-1150.
295. Curran MA, Ochoa MS, Molano RD, Pileggi A, Inverardi L, Kenyon NS, et al. (2002) Efficient transduction of pancreatic islets by feline immunodeficiency virus vectors. *Transplantation* 74: 299-306.
296. Salmon P, Oberholzer J, Occhiodoro T, Morel P, Lou J, Trono D (2000) Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol Ther* 2:404-414.
297. Ju Q, Edelstein D, Brendel MD, Brandhorst D, Brandhorst H, Bretzel RG, Brownlee M (1998) Transduction of non-dividing adult human pancreatic beta cells by an integrating lentiviral vector. *Diabetologia* 41: 736-739.
298. Caton D, Calabrese A, Mas C, Serre-Beinier V, Charollais A, Caille D, et al (2003) Lentivirus-mediated transduction of connexin cDNAs shows level- and isoform-specific alterations in insulin secretion of primary pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* 116: 2285-2294.
299. Olejnicka BT, Andersson A, Tyrberg B, Dalen H, Brunk UT (1999) Beta-cells, oxidative stress, lysosomal stability, and apoptotic/necrotic cell death. *Antioxid Redox Signal* 1: 305-315.
300. Schnell Landstrom AH, Andersson A, Borg LA (1991) Lysosomes and pancreatic islet function: adaptation of beta-cell lysosomes to various metabolic demands. *Metabolism* 40: 399-405.
301. Authier F, Rachubinski RA, Posner BI, Bergeron JJ (1994) Endosomal proteolysis of insulin by an acidic thiol metalloprotease unrelated to insulin degrading enzyme. *J Biol Chem* 269: 3010-3016.
302. Bhogal RK, Novials A, Nilsson MR, Coronado I, Gomis R, Gray D, Morris JF, Clark A (2002) Islet amyloid polypeptide (IAPP) accumulates in lysosomes of human beta-cells by crinophagy but does not form fibrils. *Diabetologia* 45 (S2): A144.
303. Salehi A, Henningsson R, Mosen H, Ostenson CG, Efendic S, Lundquist I (1999) Dysfunction of the islet lysosomal system conveys impairment of glucose-induced insulin release in the diabetic GK rat. *Endocrinology* 140: 3045-3053.

PUBLICACIONS DERIVADES D'AQUESTA TESI

COMUNICACIONS

Congressos internacionals

- Regulation of the enzyme Iduronate-2-sulfatase (IDS) in human and mice pancreatic islet. (2001) Coronado-Pons I, Fabregat ME, Julià M, Novials A, Gomis R. 37th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), Glasgow (UK). Diabetologia 44 (Sup.1): A141.
- Islet amyloid polypeptide (IAPP) accumulates in lysosomes of human beta-cells by crinophagy but does not form fibrils. (2002) Bhogal R, Novials A, Nilsson MR, Coronado I, Gomis R, Grey D, Morris JF, Clark A. 38th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), Budapest. Diabetologia 45 (Sup.2) A144.
- Effect of the enzyme Iduronate-2-Sulfatase (IDS) on the pancreatic beta-cell function in mouse islets. (2003) Coronado-Pons I, Novials A, Gomis R. 18th International Diabetes Federation Congress (IDS), Paris. Diabetes Metab 29, 4S7-4S428.

Congressos nacionals

- Estudi de l'enzim iduronat-2-sulfatasa als illots pancreàtics de ratolí. (2003) Coronado-Pons I, Novials A, Gomis R. 7è Congrés de l'associació catalana de diabetis, Bellaterra.

PUBLICACIONS

- Identification of iduronate-2-sulfatase (IDS) in mouse pancreatic islets.
Coronado-Pons I, Novials A, Clark A, Gomis R. (American Journal of Physiology, enviat).
- Effect of iduronate-2-sulfatase (IDS) on human pancreatic islets morphology.
Coronado-Pons I, Novials A, Clark A, Gomis R (en pocés).