

TESI DOCTORAL

**ESTUDI MOLECULAR I FUNCIONAL DEL RECEPTOR
D'INSULINA EN SÍNDROMES DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA.**

SUSANNA RIQUE I REBULL

Maig 2001

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE CIÈNCIES
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

**ESTUDI MOLECULAR I FUNCIONAL DEL RECEPTOR
D'INSULINA EN SÍNDROMES DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA.**

MEMÒRIA PRESENTADA PER NA SUSANNA RIQUE I REBULL
per aspirar al grau de Doctora en Ciències Biològiques
per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, Maig del 2001

SUSANNA RIQUE I REBULL

La Dra. **Neus Potau Vilalta**, Cap de Secció del Laboratori Hormonal de l'Hospital Universitari Materno-Infantil Vall d'Hebron, en qualitat de Directora

El Dr. **Antonio Carrascosa Lezcano**, Professor Titular de Pediatria de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, Cap del Servei de Pediatria de l'Hospital Universitari Materno-Infantil Vall d'Hebron, en qualitat de Director

La Dra **Carme Nogués Sanmiquel**, Professora Titular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona en qualitat de Tutora

CERTIFIQUEN:

Que Na **Susanna Riqué i Rebull** ha realitzat sota la seva direcció/tutoria el treball de recerca **Estudi molecular i funcional del receptor d'insulina en síndromes de resistència a la insulina**, per a obtenir el grau de Doctora en Ciències Biològiques.

Aquest treball s'ha dut a terme en el Servei del Laboratori Hormonal de l'Hospital Universitari Materno-Infantil Vall d'Hebron de Barcelona i en el Laboratori de Bioquímica Clínica de l'Addenbrooke's Hospital de Cambridge.

Barcelona, maig del 2001

Dra. Neus Potau Vilalta

Dr. Antonio Carrascosa Lezcano

Dra. Carme Nogués Sanmiquel

“Una alegría compartida
es transforma en doble alegría,
una pena compartida,
en mitja pena.”

Als meus pares

AGRAÏMENTS

Als Directors de la Tesi, al Dr. Carrascosa i especialment a la Dra. Potau, per donar-me la oportunitat de poder entrar en el món de la investigació i per encoratjar-me fins al final.

A la Carme Nogués per ser-hi i per donar-me ànims sempre que ho he necessitat.

A les “Nenes de l’Hospí” per ser les meves companyes aquests anys.

A la Maria Martell i a la Bea Cabot del Servei de Medicina Interna pel seu ajut amb el seqüenciador.

Al Professor S. O’Rahilly i al seu equip, molt especialment al Jonathan Whitehead, a la Maria Soos i al Dirk Berger, per donar-me l’oportunitat d’anar al seu Laboratori i aprendre a mirar la ciència amb uns altres ulls.

A l’lbo per estar sempre disposat a donar-me un cop de mà.

A totes les persones de l’Hospital que d’alguna manera m’han ajudat permetent-me utilitzar les seves instal·lacions.

Al Pep, per estar al meu costat, per la paciència, l’empenta, el gran ajut a l’hora de donar forma al text i imprimir-lo i per tantes altres coses que han fet possible que acabés aquest projecte.

A la meva família que sempre m’han fet costat i m’han encoratjat des de l’inici.

I no vull deixar d’anomenar-me a mi mateixa per l’esforç, la força de voluntat i la paciència que m’han permès arribar fins aquí!!

1.- ÍNDEX

ÍNDEX DE CONTINGUTS

<u>1.- ÍNDEX</u>	1
<u>ÍNDEX DE CONTINGUTS</u>	3
<u>ÍNDEX DE FIGURES.</u>	9
<u>ÍNDEX DE TAULES.</u>	13
<u>2.- INTRODUCCIÓ</u>	15
<u>2.1.- LA INSULINA</u>	17
<u>2.2.- EFECTES DE LA INSULINA EN EL METABOLISME</u>	18
<u>2.2.1.- Efectes immediats</u>	18
<u>2.2.2.- Efectes a llarg termini</u>	18
<u>2.3.- EL RECEPTOR D'INSULINA</u>	18
<u>2.3.1.- Síntesi i regulació</u>	18
<u>2.3.2.- Reciclatge, inactivació i degradació</u>	19
<u>2.3.3.- Activitat enzimàtica tirosina quinasa</u>	20
<u>2.3.4.- Isoformes</u>	21
<u>2.3.5.- Ubicació cel·lular</u>	21
<u>2.4.- EL GEN DEL RECEPTOR DE LA INSULINA</u>	21
<u>2.4.1.- Mapa</u>	21
<u>2.4.2.- Organització</u>	21
<u>2.4.3.- Processament alternatiu</u>	22
<u>2.4.4.- Regió promotora 5'</u>	23
<u>2.4.5.- Regió 3'</u>	23
<u>2.5.- MECANISME D'ACCIÓ DE LA INSULINA</u>	24
<u>2.5.1.- Subunitat- / Unió al receptor</u>	24
<u>2.5.2.- Subunitat- / Activació del receptor</u>	25
<u>2.5.2.1.- Fosforilació en Tirosines</u>	25
<u>2.5.2.2.- Fosforilació en Serines / Treonines</u>	26
<u>2.5.3.- Substrats intracel·lulars</u>	26
<u>2.5.4.- Vies de senyalització</u>	28
<u>2.5.4.1.- p42/p44Map quinasa (mitogen activated protein kinase)</u>	28
<u>2.5.4.2.- PI3 quinasa / PKB</u>	30
<u>2.6.- RESISTÈNCIA A LA INSULINA</u>	31
<u>2.6.1.- Definició</u>	31
<u>2.6.2.- Condicions i defectes associats a la resistència a la insulina</u>	32
<u>2.6.2.1.- Diabetis Mellitus Tipus 2</u>	34
<u>2.6.2.2.- Obesitat</u>	34
<u>2.6.2.3.- Intolerància a la glucosa</u>	34
<u>2.6.3.- Síndromes associades a la resistència severa a la insulina</u>	35
<u>2.6.3.1.- Anticossos anti-receptor d'insulina</u>	36

<u>2.6.3.2.- Mutacions en el gen del receptor d'insulina</u>	37
<u>2.6.3.2.1.- Leprechaunisme</u>	37
<u>2.6.3.2.2.- Síndrome de Rabson-Mendenhall</u>	38
<u>2.6.3.2.3.- Resistència a la insulina Tipus A o de Kahn</u>	38
<u>2.6.3.3.- D'altres síndromes associades a resistència severa a la insulina</u>	39
<u>2.6.4.- Classificació de les mutacions en el gen del receptor d'insulina</u>	40
<u>2.6.4.1.- Mutacions de Classe I</u>	40
<u>2.6.4.1.1.- Mutacions que introdueixen un codó d'aturada prematur</u>	40
<u>2.6.4.1.2.- D'altres mutacions que actuen en <i>cis</i> i que no alteren la seqüència aminoacídica del receptor</u>	41
<u>2.6.4.2.- Mutacions de Classe II</u>	41
<u>2.6.4.3.- Mutacions de Classe III</u>	41
<u>2.6.4.4.- Mutacions de Classe IV</u>	42
<u>2.6.4.4.1.- Efecte dominant negatiu de les mutacions en el domini tirosina quinasa</u>	42
<u>2.6.4.5.- Mutacions de Classe V</u>	44
<u>2.6.5.- Mutacions descrites</u>	44
<u>2.7.- AGENTS ANTIDIABÈTICS</u>	48
<u>2.7.1.- La Metformina</u>	48
<u>3.- OBJECTIUS</u>	51
<u>4.- PACIENTS</u>	55
<u>5.- MATERIAL I MÈTODES</u>	59
<u>5.1.- EXTRACCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE L'ADN.</u>	61
<u>5.2.- AMPLIFICACIÓ MITJANÇANT LA TÈCNICA DE LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</u>	61
<u>5.2.1.- Reactius i concentracions</u>	61
<u>5.2.2.- Protocol d'amplificació</u>	62
<u>5.3.- ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA</u>	63
<u>5.3.1.- Agarosa</u>	63
<u>5.3.2.- Tinció amb Bromur d'Etidi</u>	63
<u>5.3.3.- Tampó de càrrega</u>	63
<u>5.3.4.- Condicions d'electroforesi</u>	63
<u>5.3.5.- Visualització dels productes i determinació del pes molecular</u>	63
<u>5.4.- PURIFICACIÓ DELS PRODUCTES DE PCR</u>	64
<u>5.5.- ANÀLISI CONFORMACIONAL DE POLIMORFISMES DE CADENA SENZILLA: SSCP</u>	64
<u>5.5.1.- Condicions per la SSCP</u>	64
<u>5.5.1.1.- Condicions electroforètiques</u>	64
<u>5.5.1.2.- Acrilamida / Bisacrilamida</u>	64

5.5.1.3.- Iniciadors i catalitzadors de la polimerització	65
5.5.1.4.- Glicerol	65
5.5.1.5.- El tampó	65
5.5.1.6.- Temperatura	65
5.5.1.7.- Longitud i composició del producte	65
5.5.1.8.- Tampó de càrrega desnaturalitzant	65
5.5.2.- Tinció dels gels de poliacrilamida	67
5.5.2.1.- Tinció amb Bromur d'Etidi	67
5.5.2.2.- Tinció amb Nitrat de Plata	67
5.6.- SEQÜENCIACIÓ DELS PRODUCTES DE PCR	67
5.7.- MUTAGÈNESI DIRIGIDA	72
5.7.1.- ADNc del receptor d'insulina	72
5.7.1.1.- pRc.CMV.RI	72
5.7.1.2.- pUC18.RI	73
5.7.2.- Encebadors mutagènics	74
5.7.3.- Gene Editor <i>in vitro</i> Site-Directed Mutagenesis System	74
5.7.3.1.- Desnaturalització alcalina de la doble cadena d'ADN	76
5.7.3.2.- Hibridació dels encebadors al motlle	76
5.7.3.2.1.- Fosforilació dels encebadors	76
5.7.3.2.2.- Reacció control	77
5.7.3.2.3.- Reacció de mutagènesi	77
5.7.3.3.- Síntesi de la cadena mutada	77
5.7.3.4.- Transformació en les cèl·lules competents BMH71-18 mutS	78
5.7.3.5.- Purificació de l'ADN plasmídic	78
5.7.3.6.- Transformació en les cèl·lules JM109	79
5.7.3.7.- Anàlisi dels transformants	79
5.7.3.7.1.- Seqüenciació directa (Big Dye)	80
5.7.4.- QuikChange <i>Site-Directed</i> Mutagenesis Kit	81
5.7.4.1.- Reacció control	82
5.7.4.2.- Reacció de mutagènesi	82
5.7.4.3.- Protocol d'amplificació	82
5.7.4.4.- Digestió dels productes	83
5.7.4.5.- Transformació en les cèl·lules Supercompetents E. Coli XL1 Blue	83
5.7.4.6.- Anàlisi dels transformants	83
5.8.- CLONACIÓ DEL RI.VAL1028 EN EL VECTOR PRc.CMV	84
5.8.1.- Digestió del pUC18.RI1028 i del pRc.CMV amb HindIII	84
5.8.2.- Defosforilació de pRc.CMV digerit amb Hind III	84
5.8.3.- Electroforèsi de comprovació en gel d'agarosa	84
5.8.4.- Purificació de el RI.Val1028 del gel d'agarosa	85

5.8.5.- Lligació del RI.Val1028 en el pRc.CMV	85
5.8.6.- Transformació en les cèl·lules Competents JM109	86
5.8.7.- Anàlisi de l'orientació de l'insert RI.Val1028 en el pRc.CMV	86
5.8.8.- Obtenció de l'ADN plasmídic pRc.CMV.RI1028	87
5.9.- CULTIUS CEL·LULARS	87
5.9.1.- Cèl·lules d'Ovari de Hàmster Xinès (CHO)	87
5.9.2.- Cèl·lules CL6	87
5.9.3.- Cèl·lules MOCK	88
5.10.- TRANSFECCIÓ EN CÈL·LULES D'OVARI DE HÀMSTER XINÈS CHO	88
5.11.- ESTIMULACIÓ I LISIS DE CÈL·LULES	89
5.12.- TRACTAMENT AMB METFORMINA DE LES CÈL·LULES TRANSFECTADES CHO-RI.Val1028, CHO-RI.WT/VAL1028 I CHO-RI.WT.	89
5.13.- ANÀLISI D'UNIÓ DE LA INSULINA AL RECEPTOR; BINDING	90
5.13.1.- Lisat de cèl·lules. 'in vitro'	90
5.13.2.- Cèl·lules senceres. 'in situ'	90
5.14.- WESTERN BLOT	90
5.14.1.- Autofosforilació	90
5.14.2.- Expressió del receptor	91
5.15.- EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR EN MEMBRANA; BIOTINITZACIÓ	91
5.16.- ANÀLISI DE L'ACTIVITAT TIROSINA QUINASA	91
5.17.- EXTRACCIÓ D'ARN A PARTIR DE FIBROBLASTS EN CULTIU	92
5.18.- AMPLIFICACIÓ DE L'ARN MITJANÇANT LA RETRO-TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-PCR)	92
5.19.- CLONACIÓ DELS PRODUCTES DE LA RT-PCR	93
5.20.- PURIFICACIÓ I SEQÜENCIACIÓ DELS PRODUCTES CLONATS	94
5.21.- STOCKS DE GLICEROL	94
6.- RESULTATS	95
6.1.- PCR	97
6.2.- SSCP	99
6.3.- SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA	102
6.4.- MUTACIÓ LEU140	109
6.4.1.- Mutagènesi dirigida	109
6.4.2.- Expressió total en el llisat cel·lular	110
6.4.3.- Biotinització	111
6.4.4.- Unió de la insulina al receptor	111
6.4.4.1.- 'in vitro'	112
6.4.4.2.- 'in situ'	112
6.4.5.- Autofosforilació	114
6.4.6.- Activitat tirosina quinasa	115
6.5.- MUTACIÓ ACCEPTOR D'SPLICING-1239ATURADA	115

<u>6.5.1.- Obtenció de l'ARNm mitjançant RT-PCR</u>	115
<u>6.5.2.- Mutagènesi dirigida</u>	118
<u>6.5.3.- Expressió</u>	119
<u>6.5.4.- Unió de la insulina al receptor</u>	120
<u>6.5.4.1.- 'in vitro'</u>	120
<u>6.5.5.- Autofosforilació</u>	121
<u>6.5.6.- Activitat tirosina quinasa</u>	122
<u>6.6.- MUTACIÓ VAL1028</u>	122
<u>6.6.1.- Mutagènesi dirigida</u>	122
<u>6.6.2.- Expressió</u>	124
<u>6.6.3.- Biotinització</u>	124
<u>6.6.4.- Unió de la insulina al receptor</u>	125
<u>6.6.4.1.- 'in vitro'</u>	125
<u>6.6.4.2.- 'in situ'</u>	126
<u>6.6.5.- Autofosforilació</u>	127
<u>6.6.6.- Activitat tirosina quinasa</u>	127
<u>6.7.- DETERMINACIÓ DE L'EFECTE DOMINANT NEGATIU DE LA MUTACIÓ VAL1028</u>	128
<u>6.8.- EFECTE DE LA METFORMINA EN ELS RECEPTORS RI.VAL1028, RI.WT I RI.WT/VAL1028</u>	129
<u>6.8.1.- Expressió</u>	129
<u>6.8.2.- Unió de la insulina al receptor</u>	130
<u>6.8.2.1.- 'in vitro'</u>	130
<u>6.8.3.- Autofosforilació</u>	131
<u>6.8.4.- Activitat tirosina quinasa</u>	132
<u>6.9.- MUTACIONS LYS15 I ATURADA1000</u>	133
<u>6.10.- VARIANT VAL985MET</u>	134
<u>7.- DISCUSSIÓ</u>	135
<u>7.1.- TÈCNiques MOLECULARS APLICADES A L'ESTUDI DEL RECEPTOR D'INSULINA</u>	137
<u>7.2.- TÈCNiques EMPRADES PER DETERMINAR LA FUNCIONALITAT DELS RECEPTORS D'INSULINA</u>	139
<u>7.3.- PACIENTS AMB RESISTÈNCIA A LA INSULINA SUBSIDIARIS DE PRESENTAR MUTACIONS EN EL GEN DEL RECEPTOR D'INSULINA</u>	141
<u>7.3.1.- Pacients amb resistència a la insulina d'etiologia desconeguda</u>	141
<u>7.3.2.- Pacients amb Obesitat</u>	142
<u>7.3.3.- Pacients amb Lipodistrofia</u>	142
<u>7.3.4.- Pacients amb la síndrome de Leprechaunisme</u>	142
<u>7.3.5.- Pacients amb la síndrome de Rabson Mendenhall</u>	143
<u>7.3.6.- Pacients amb la síndrome de resistència a la insulina Tipus A o de Kahn</u>	146

<u>7.3.6.1.- Mutacions que afecten la síntesi del receptor i la unió de la insulina</u>	146
<u>7.3.6.2.- Mutacions que afecten als llocs de processament de l'ARNm</u>	150
<u>7.3.6.3.- Mutacions que afecten al domini tirosina quinasa</u>	154
<u>7.3.6.3.1.- Estudi de l'efecte dominant negatiu</u>	160
<u>7.4.- VARIANT VAL985MET</u>	161
<u>7.5.- MECANISME D'ACCIÓ DE LA METFORMINA. EFECTE SOBRE ELS RECEPTORS RI.WT I RI.VAL1028</u>	163
<u>8.- CONCLUSIONS</u>	166
<u>9.- ARTICLES</u>	170
<u>10.- ÍNDEX D'ABREVIATURES</u>	178
<u>11.- BIBLIOGRAFIA</u>	186

ÍNDIX DE FIGURES.

Figura 1.-	Representació de la insulina humana. Els ponts disofre entre les Cys estan representats per les línies taronja.....	17
Figura 2.-	Esquema del receptor d'insulina humà.....	19
Figura 3.-	Esquema dels exons del gen del receptor d'insulina i dels possibles dominis proteics. La posició dels introns està indicada per puntes de fletxa. La numeració dels exons està entre els introns. La seqüència d'aminoàcids consens del lloc de processament està indicada segons el codi aminoacídic d'una sola lletra. EGF: Epidermal Growth Factor.....	22
Figura 4.-	Representació de la via de senyalització de la insulina-receptor a través de la p42/p44 Map quinasa. Yp: tirosines fosforilades, IRS: substrat del receptor d'insulina, PTB: domini d'unió a fosfotirosines, SH2: Src homology 2, Grb2: growth factor receptor-bound protein 2, Sos: son of sevenless, p21 Ras: petita proteïna G, Raf 1: quinasa, MAPKK (MEK): MAP quinasa quinasa, MAPKAK1: serín/treonín quinasa.....	30
Figura 5.-	Representació de la via de senyalització a través de la Fosfoinositol 3 quinasa (PI3K). Yp/Tp/Sp: tirosines/treonines/serines fosforilades, p85/p110: subunitat reguladora i catalítica respectivament de la PI3K, SH2: Src homology 2, PKB: proteín quinasa B, PDKs: quinases dependents del fosfatidil, mTOR: mammalian target of Rampamycin, GSK3: glycogen syntase kinase 3, PFK2: 6-phosphofructo2-kinase.....	31
Figura 6.-	Classificació de les mutacions en el receptor d'insulina segons l'efecte que exerceixen sobre la via de síntesi, processament, funció i degradació naturals del receptor.....	40
Figura 7.-	Representació de la hipòtesi de l'efecte dominant de les mutacions en els dominis tirosina quinasa del receptor d'insulina. La segregació, en el cas d'heterozigosi, és 25% WT/WT (Wild type), 50% WT/Mutant i 25% Mutant/Mutant, de manera que el 75% dels receptors portarien la mutació i per tant tindrien l'activitat enzimàtica inhibida.....	43
Figura 8.-	Esquema de la biguanida Metformina.....	48
Figura 9.-	Seqüència parcial del gen del receptor d'insulina humà. Els aminoàcids i els nucleòtids que els componen es mostren en la figura. També s'assenyala l'inici i el final de cada exó amb el número d'aminoàcid. (La figura continua en les tres pàgines següents).....	68
Figura 10.-	Esquema del vector pRc.CMV amb l'insert Receptor d'Insulina humà (segons Ullrich). Promotor CMV; promotor citomegalovirus. Ampr; gen de resistència a l'Ampicilina. Neor; gen de resistència a la Neomicina.....	72
Figura 11.-	Esquema del vector pUC18 amb l'insert Receptor d'Insulina humà (segons Ullrich). Ampr; gen de resistència a l'Ampicilina. ORI; origen de replicació.	73

Figura 12.- Esquema del procediment de mutagènesi amb el sistema GeneEditor <i>in vitro</i> Site-Directed Mutagenesis System.....	75
Figura 13.- Esquema del procediment de mutagènesi emprant el sistema QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit.....	81
Figura 14.- Imatge dels productes de PCR dels exons 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 i 13. El producte de l'exó 13 no dona senyal en les condicions d'amplificació estàndards. Gel d'agarosa al 2%.....	98
Figura 15.- Imatge dels productes de PCR dels exons 4, 7, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 i 22. En l'exó 16 s'aprecia molta amplificació inespecífica quan s'amplifica amb les condicions sàndals. Gel d'agarosa al 2%.....	98
Figura 16.- Es poden veure gels de diferents mostres amb canvis conformacionals en diferents exons. Els nombres corresponen a les mostres dels pacients. Els controls s'indiquen amb una C. Els controls positius cedits pel Prof. S. O'Rahilly s'indiquen amb una C+. Les fletxes indiquen les diferents conformacions.....	100
Figura 17.- Imatges de les seqüències mutades del gen del receptor d'insulina en els pacients estudiats. a) Lys15Asp, b) Val140Leu (seqüència down o antisentit), c) Arg1000Aturada, d) Ala1028Val, e) acceptor d'splice intró 21. Totes les mutacions estan en heterozigosi.....	107
Figura 18.- Seqüència de l'exó 13 on falten dues bases en la regió intrònica 3', una de les quals pertany a la regió on s'uneix l'encebador per amplificar aquesta regió.....	108
Figura 19.- Western blot de l'expressió del receptor RI.Leu140. A uns 200 KDa trobem el proreceptor d'insulina, el pes molecular de la subunitat del receptor d'insulina és de 95 KDa.....	110
Figura 20.- Western blot de la biotinització del receptor RI.Leu140.....	111
Figura 21.- Representació de la unió de la insulina <i>in vitro</i> pels receptors WT i RI.Leu140. La diferència és significativa.....	112
Figura 22.- Unió de la insulina <i>in situ</i> . Representació dels valors estandarditzats segons l'expressió total del receptor en el llisa cel·lular (140), i segons l'expressió del receptor en la superfície cel·lular (biot). Els resultats es comparen amb el receptor RI.WT (wt).....	113
Figura 23.- Corbes d'Scathard dels receptors RI.WT i RI.Leu140. Es detecta una menor afinitat per la unió de la insulina dels receptors mutats enfront dels receptors RI.WT (0,5nM vs. 0,3nM).....	113
Figura 24.- Representació de l'autofosforilació dels receptors RI.WT i RI.Leu140. La diferència entre els receptors és significativa. P=0,001.....	114
Figura 25.- Representació de l'activitat tirosina quinasa dels receptors RI.WT i RI.Leu140. La diferència observada és estadísticament significativa. P=0,001.....	115

- Figura 26.-** Electroforesi en gel d'agarosa de l'extracció de l'ARNm de les pacients A1 i A2 i de diferents controls.....116
- Figura 27.-** La seqüència en vermell correspon a seqüència de l'intró 21, **GT**= donador d'splicing wt, **GT**= donador d'splicing críptic, **AG**= acceptor d'splicing wt, **AG**= acceptor d'splicing críptic, **A**= primera base de l'exó 22 que es detecta en les seqüències mutades, **GT** i **C**= bases que formen l'aminoàcid Val1028 en la seqüència WT. a) seqüència WT. b) Seqüència mutada 1; s'aboleix el lloc acceptor d'splicing WT (**AG**) i s'activa el lloc críptic **AG**, de manera que la primera base l'exó 22 que es troba en la seqüència de és la **A**. c) Seqüència mutada 2; s'aboleixen els llocs donador WT (**GT**) i acceptor WT (**AG**) d'splicing i s'activen els llocs donador **GT** i acceptor **AG** críptics, de manera que la primera base de l'exó 22 que es troba en la seqüència és la **A**.....117
- Figura 28.-** En vermell es marca el codó sèpia en l'encebador mutagènic, en blau es marca el codó en la seqüència WT que ha de ser mutat. Cal destacar la complementarietat entre les bases dels dos codons (**T/A**, **G/C** i **A/T**).....118
- Figura 29.-** El vermell indica el codó sèpia introduït, el rosa indica el nucleòtid que pateix la deleció (en el codó 1238) i el verd és la seqüència resultant del corriment del marc de lectura degut a la deleció.....119
- Figura 30.-** Representació de l'expressió en el llisat cel·lular dels receptors RI.1239Aturada i RI.WT. A 195KDa es detecta la banda del proreceptor WT, a 175KDa es detecta la banda del proreceptor mutat, la subunitat dels receptors es detecta a 135KDa.....120
- Figura 31.-** Representació de la unió de la insulina in vitro dels receptors RI.WT, RI.1239-Aturada.....121
- Figura 32.-** Western blot de l'autofosforilació del receptor aturada RI.1239Aturada. Tal i com es pot comprovar no hi ha fosforilació en el receptor mutat. +; estimulació amb insulina. -; no estimulació.....121
- Figura 33.-** Representació de l'activitat tirosina quinasa. El receptor RI.1239Aturada pràcticament no presenta aquesta activitat.....122
- Figura 34.-** Representació dels nivells d'expressió del receptor RI.Val1028 respecte als del receptor RI.WT. Es pot comprovar que el receptor mutat 1028 s'expressa de forma paral·lela al receptor estàndard.....124
- Figura 35.-** Representació de l'expressió a membrana plasmàtica dels receptors RI.WT i RI.Val1028. Els nivells d'expressió d'ambdós tipus de receptors són gairebé equivalents.....125
- Figura 36.-** Esquema de la unió in vitro dels receptors RI.WT i RI.Val1028. El receptor mutat presenta un increment significatiu en la unió respecte al RI.WT, per tenir en compte aquesta diferència és necessari relacionar les dades de les diferents proves funcionals.....126

- Figura 37.-** Corbes d'Scatchard pels receptors RI.Val1028 i RI.WT. Es pot comprovar que les corbes són molt iguals i el punt de tall en el 50% d'unió coincideix en 0,3nM.....126
- Figura 38.-** Western blot de l'estudi de fosforilació del receptor RI.Val1028. S'indica amb el signe + les mostres estimulades amb insulina i amb el signe - les mostres sense estimular. Es pot veure en les mostres del receptor mutat que no s'observa fosforilació del receptor ni en les mostres estimulades ni en les mostres sense estimular, per tant aquest receptor no es fosforila.....127
- Figura 39.-** Representació de l'activitat tirosina quinasa. El receptor RI.Val1028 presenta una activitat pràcticament nul·la. $P=0,001$128
- Figura 40.-** Expressió de la cotransfecció dels receptors RI.WT i RI.Val1028.....128
- Figura 41.-** Autofosforilació dels receptors RI.WT, RI.WT/Val1028. a) es detecta la meitat de fosforilació en els receptors coexpressats respecte als receptors RI.WT. b) pràcticament no es detecta autofosforilació en els receptors coexpressats.....129
- Figura 42.-** Expressió dels receptors incubats en diferents condicions d'estimulació. No es veuen diferències en l'expressió en les diferents condicions.....130
- Figura 43.-** Representació de la unió *in vitro* de la insulina pels diferents receptors incubats en les diferents condicions. La incubació de les cèl·lules només amb Metformina no modifica la unió.....131
- Figura 44.-** Representació de la fosforilació dels receptors RI.WT, RI.WT/Val1028 i RI.Val1028 estimulats amb insulina i amb insulina+Metformina.....132
- Figura 45.-** Representació de l'activitat tirosina quinasa dels receptors RI.WT, RI.WT/Val1028 i RI.Val1028 estimulats amb insulina o amb insulina+Metformina.....133
- Figura 46.-** Arbre genealògic de la família afectada de la síndrome de Rabson-Mendenhall. En vermell està assenyalat el pacient estudiat. En blau s'assenyala un altre membre afecte de la citada síndrome. L'individu I-4 és la tia de l'individu I-6. L'individu II-3 va morir a l'edat de dos anys, es desconeix la causa.....133
- Figura 47.-** Corba d'scathard de la unió de la insulina en els receptors d'eritròcits en la família del pacient RM1. ; pacient RM1, _; pare del pacient RM1, _; mare del pacient RM1.....144
- Figura 48.-** Representació de les seqüències consens donadora i acceptora d'splicing en els introns. P=A/G, Q=T/C, N=qualsevol nucleòtid.....150

ÍNDIX DE TAULES.

<u>Taula 1.-</u>	<u>Condicions patològiques associades a la resistència a la insulina.taula parcialment extreta de la referència (45) i modificada per l'autor.....</u>	33
<u>Taula 2.-</u>	<u>Síndromes associades a la resistència extrema a la insulina. Taula parcialment extreta de la referència (45) i modificada per l'autor.....</u>	36
<u>Taula 3.-</u>	<u>Mutacions descrites en el gen del receptor d'insulina de diferents pacients (1-77) amb resistència a la insulina i l'efecte que aquestes exerceixen sobre el receptor. (La taula continua en les dues pàgines següents)</u>	45
<u>Taula 4.-</u>	<u>Caracterització bioquímica dels pacients afectes de resistència a la insulina i dels seus familiars: Resist. a la insulina: Resistència a la Insulina d'etiologia desconeguda. F: Femení. M: Masculí. * Familiars dels pacients. Pic en la corba d'insulina. * Pares del nadó a testar per la síndrome de Leprechaunisme.....</u>	58
<u>Taula 5.-</u>	<u>Parelles d'encebadors per amplificar els exons del gen del receptor d'insulina humà. Numeració segons Ebina i cols. (11). Els números entre parèntesi indiquen la posició de l'encebador en la seqüència presentada en la Figura. 9. (taula extreta de la referència (81)).</u>	62
<u>Taula 6.-</u>	<u>Condicions per a la tècnica del SSCP.....</u>	66
<u>Taula 7.-</u>	<u>Característiques dels encebadors mutagènics. (*) indica que els encebadors estan purificats. Els nucleòtids subratllats i en negreta corresponen a la mutació que es vol introduir. La mutació en els encebadors LEU140 SENSE/ANTI-SENSE introdueix una Leu (TTG) en el lloc d'una Val (GTG). En els encebadors VAL1028 SENSE/ANTI-SENSE i 1028 ANTI-LONG/ANTI-SHORT la mutació canvia una Ala (GCG) per una Val (GTG). Els encebadors Stop 1239 sense i antisense introdueixen una Aturada (TGA) en el codó 1239 en comptes de la Thr (ACT).....</u>	74
<u>Taula 8.-</u>	<u>Encebadors emprats per amplificar la regió que comprèn les mutacions inserides Leu140, Val1028.....</u>	80
<u>Taula 9.-</u>	<u>Encebadors emprats detectar les mutacions Val1028 i la mutació d'splicing.....</u>	83
<u>Taula 10.-</u>	<u>Característiques dels encebadors emprats per analitzar l'orientació de l'insert Receptor d'Insulina humà en el vector pRc.CMV.....</u>	86
<u>Taula 11.-</u>	<u>Encebadors emprats per amplificar el producte obtingut de la reacció RT.</u>	93
<u>Taula 12.-</u>	<u>Canvis detectats mitjançant la tècnica de SSCP Les mostres amb modificacions en els exons 4, 6 i 20 són controls positius per canvis conformacionals donats pel Dr. S. O'Rahilly de l'Addenbrooke's Hospital (Cambridge, Anglaterra). La resta de mostres són de pacients i de controls (individus sense resistència ala insulina) estudiats en el nostre laboratori.</u>	99

Taula 13.- Seqüenciació dels exons del gen del receptor d'insulina dels pacients estudiats. En negreta es marquen els canvis en heterozigosi. Els canvis amb homozigosi no estan marcats. Amb groc s'indiquen les mutacions trobades en els pacients. (La taula continua les dues pàgines següents). 103

2.- INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

2.1.- LA INSULINA

La insulina és una hormona pancreàtica descoberta per Banting i Best el 1922. Des d'aleshores s'ha fet un gran progrés en el coneixement i la comprensió de la seva química, fisiologia i mode d'acció (1). La insulina se sintetitza en els illots de Langerhans del pàncreas en forma d'un precursor la preproinsulina, la qual serà transformada en l'aparell de Golgi per donar lloc a la proinsulina, una molècula més estable de 9.000 Da. La proinsulina pateix un nou procés de maduració, abans de la secreció, per mitjà d'una proteasa que trenca la molècula donant lloc dos pèptids equimoleculars, la insulina i el pèptid C, de 6.000 i 3.000 Da respectivament (2). La insulina està formada per dues cadenes polipeptídiques, A i B, que estan connectades per dos ponts disulfur que són claus per mantenir al seva activitat (3) (**figura 1**).

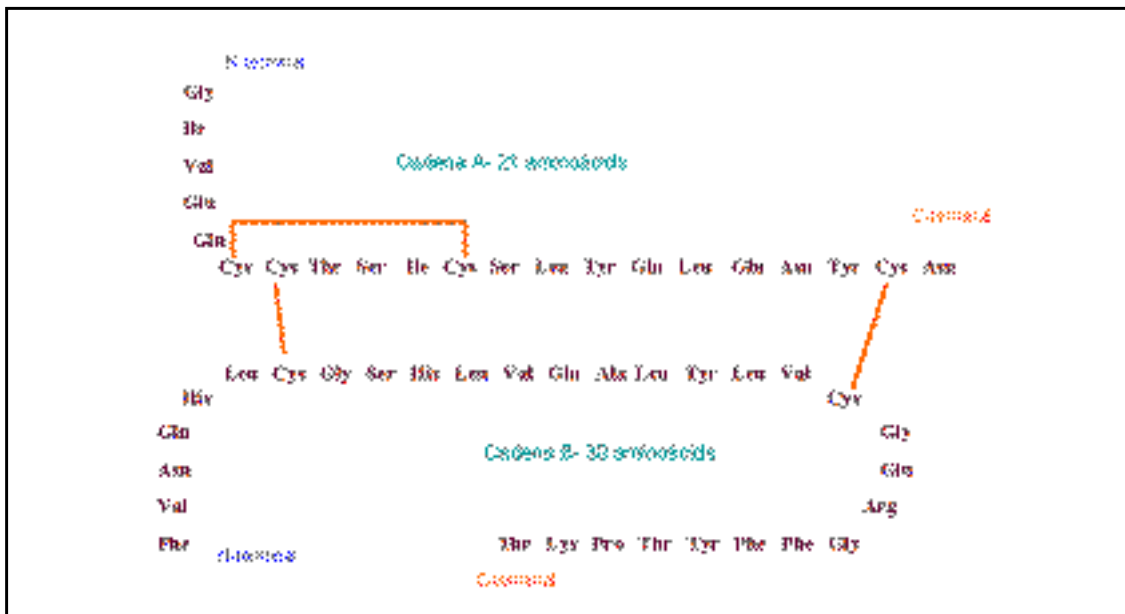


Figura 1.- Representació de la insulina humana. Els ponts disulfur entre les Cys estan representats per les línies taronja

2.2.- EFECTES DE LA INSULINA EN EL METABOLISME

La insulina és una de les hormones anabòliques més potents, les seves accions metabòliques es donen majoritàriament en el múscle, fetge i teixit adipós. La insulina incrementa la utilització de glucosa de la sang i promou la seva conversió a glicogen i triglicèrids. Aquesta hormona també promou la síntesis de proteïnes. Al mateix temps la insulina també exerceix un paper inhibidor en el trencament dels triglicèrids i del glicogen, i en el fetge pot inhibir la gluconeogènesi i la cetogènesi. Aquestes accions són dutes a terme en una combinació d'efectes immediats i a llarg termini (4).

2.2.1.- EFECTES IMMEDIATS

En pocs segons la insulina incrementa l'oferta intracel·lular de substrats per a l'emmagatzematge d'energia, estimulants sistemes de transport i intensificant l'absorció de glucosa, aminoàcids i àcids grassos. En qüestió de minuts l'activitat més important se centra en la regulació de l'activitat de determinats enzims que són clau en el metabolisme mitjançant canvis en la seva fosforilació (4).

2.2.2.- EFECTES A LLARG TERMINI

Els efectes a més llarg termini inclouen canvis en l'expressió gènica mitjançant la regulació de la transcripció de l'ADN i canvis en la velocitat de la traducció (4).

2.3.- EL RECEPTOR D'INSULINA

2.3.1.- SÍNTESI I REGULACIÓ

El receptor d'insulina és sintetitzat inicialment com un únic polipèptid, el pre-receptor, que conté tant la subunitat α com la subunitat β (5). Aquest polipèptid haurà de patir una sèrie de modificacions per tal de generar el receptor madur.

El pre-receptor específic amb una massa aparent de 170KDa pateix una reorganització dels sofres i una glicosilació N-ligada donant lloc a un pre-receptor que presenta una massa aproximada de 190KDa. Aquestes espècies monomèriques, que poden unir la insulina, s'associen entre elles mitjançant ponts de sofre per formar dímers. Aquests dímers són tallats proteolíticament per generar l'heterotetràmer $\alpha_2\beta_2$ madur. Aquest procés de maduració es dona en el Reticle endoplasmàtic (5). Un cop a l'aparell de Golgi els oligosacàrids N-ligats seran modificats per donar lloc a oligosacàrids complexos (5). L'addició dels carbohidrats N-ligats al receptor d'insulina és necessària per la formació de les estructures terciària i quaternària del receptor (5). El receptor madur és localitzat en la membrana plasmàtica com un heterotetràmer ($\alpha_2\beta_2$), on la

subunitat α amb un pes de 135KDa té la capacitat d'unir la insulina, i la subunitat β de 95KDa té activitat tirosina quinasa intrínseca (**figura 2**).

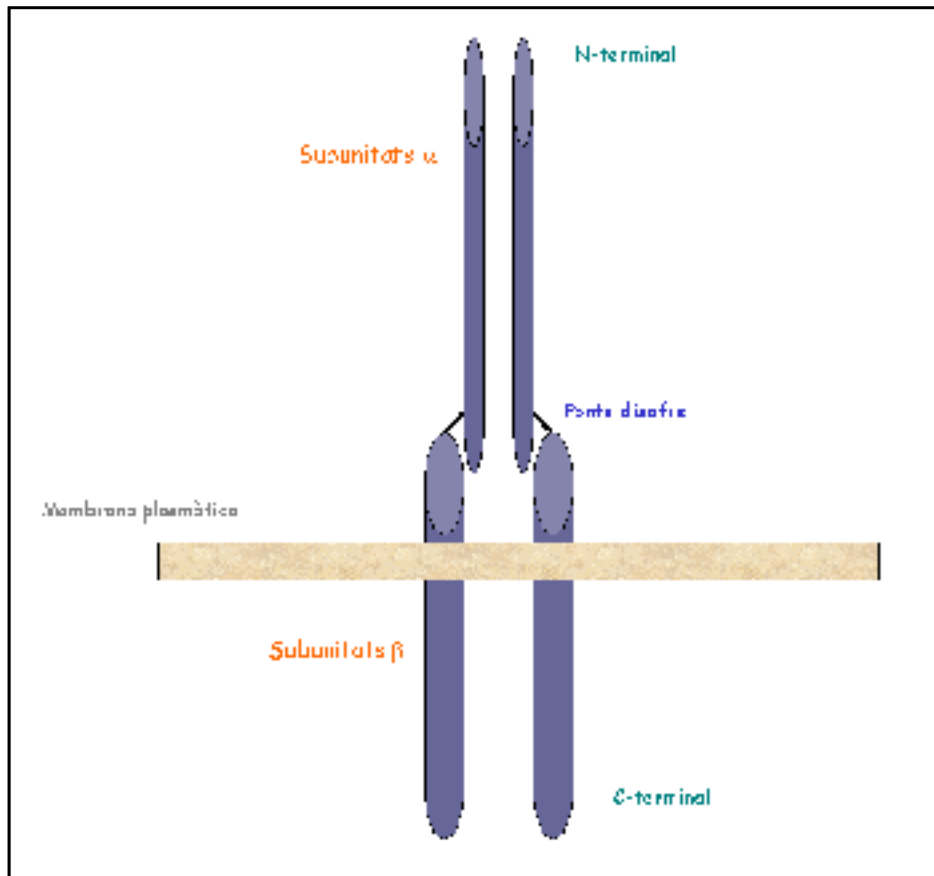


Figura 2.- Esquema del receptor d'insulina humà.

El nombre de receptors presents a la membrana pot variar en funció de la concentració del seu lligand. El tractament de cèl·lules en cultiu amb un excés d'insulina fa disminuir el nombre de receptors d'insulina cel·lulars, fet que es coneix com "down regulation" (5). Aquesta reducció en el nombre de receptors és deguda a un increment en la velocitat d'inactivació dels receptors, sense que es detecti cap efecte en la velocitat de síntesi, transcripció ni traducció (5). Per contra el tractament de les cèl·lules amb dexametasona, incrementa el nombre de receptors, fet que es coneix com a "up regulation", degut a un increment en la transcripció d'aquest (5).

2.3.2.- RECICLATGE, INACTIVACIÓ I DEGRADACIÓ

Un cop la subunitat α del receptor ha unit la insulina aquest complex és internalitzat cap a la cèl·lula via endocitosi mediada per receptor, donant lloc a una vesícula d'endocitosi. El pH d'aquestes vesícules es va acidificant, el que permet la dissociació de

la insulina del seu receptor, pas imprescindible per a la degradació de la insulina (5,6). Un cop el receptor s'ha alliberat de la insulina aquest es pot reciclar cap a la membrana plasmàtica o bé pot ser inactivat i degradat en el lisosoma.

En la regulació del reciclatge del receptor d'insulina està implicat l'estat de fosforilació de les tirosines situades en la subunitat del receptor. La fosforilació de les tirosines no és imprescindible per a la internalització del receptor, aquest és fosforilat tant quan està a la membrana com quan està en els endosomes (5). Perquè el receptor pugui tornar a la membrana primer és defosforilat mitjançant una fosfatasa, que és una peça clau en el reciclatge del receptor (6).

La via de la inactivació i degradació és poc coneguda però s'ha vist que la presència de compartiments acidificats no és necessària per la inactivació. La localització subcel·lular de la degradació també és desconeguda. Se sap que un cop associat a l'aparell endosomal, la insulina es dissocia del receptor però no se sap si el complex insulina-receptor en els lisosomes s'hi troba gràcies a la mediació de la insulina, o és el propi receptor que un cop alliberat de la insulina és dipositat en els lisosomes (5). El mecanisme proteolític de degradació del receptor d'insulina no està definit. El que és clar és que el receptor d'insulina es va degradant amb el temps (5).

2.3.3.- ACTIVITAT ENZIMÀTICA TIROSINA QUINASA

El receptor d'insulina pertany a la família de receptors amb activitat tirosina quinasa intrínseca. Les subunitats del receptor presenten aquesta activitat enzimàtica que catalitza tant l'autofosforilació de la pròpia subunitat com la fosforilació depenent d'insulina de substrats proteics exògens. Les fosforilacions es donen en residus de tirosines, situades a la subunitat que provoquen l'increment de l'eficiència catalítica de la quinasa (7).

2.3.4.- ISOFORMES

Es coneixen dues isoformes del receptor d'insulina les quals difereixen per l'absència (HIR-A) o la presència (HIR-B) d'una seqüència de dotze aminoàcids localitzats en la regió COOH-terminal de la subunitat (8).

2.3.5.- UBICACIÓ CEL·LULAR

El receptor d'insulina es troba a la membrana de gairebé tots els tipus cel·lulars, encara que en un nombre molt més elevat en teixits diana per la insulina com són fetge, múscul i teixit adipós.

2.4.- EL GEN DEL RECEPTOR DE LA INSULINA

2.4.1.- MAPA

Aquest receptor està codificat per un únic gen situat a la part distal del braç curt del cromosoma 19, entre les sub-bandes 19p13.2 i 19p13.3. Aquest gen ocupa més de 130 Kpb (9).

2.4.2.- ORGANITZACIÓ

La seqüència del ADNc d'aquest gen va ser elucidada al mateix temps per dos grups diferents, Ulrich i cols. (10) i Ebina i cols. (11) al 1985, els quals van predir una seqüència del precursor del receptor de 1370 i 1382 aminoàcids respectivament. Aquesta diferència en la mida és deguda a l'absència o presència de 36pb (12 aminoàcids) que codifiquen per l'exó 11. La regió codificant comprèn 22 exons que estan interromputs per seqüències intròniques amb una distribució que segueix el patró exó-intró. Els 22 exons representen regions de mida diferent que van des del més petit de 36pb fins al més gran amb més de 2.500pb. Aquestes regions divideixen el gen en segments que codifiquen per elements estructurals i/o elements funcionals del receptor. Els 11 exons que codifiquen per la subunitat α estan dispersos per una regió d'unes 90Kpb, mentre que els 11 exons que codifiquen per la subunitat β es troben junts en una regió d'aproximadament 30Kpb (12,13). De manera específica l'exó 1 codifica pel pèptid senyal i l'exó 2 per la zona d'unió a la insulina. Els exons 4 i 5 no estan ben especificats. La regió codificant per l'exó 6 podria estar relacionada amb interaccions de cooperativitat. Dels exons 7-10 existeix poca informació. L'exó 11 és un dels millor estudiats, codifica per l'extrem COOH-terminal de la subunitat α i és el més petit. L'exó 12 codifica per la seqüència Arg-Lys-Arg-Arg que és la de trencament en el processament del proreceptor, i també codifica per l'extrem NH₂-terminal de la subunitat β del receptor. Dels exons 13 i 14 no hi ha informació. L'exó 15 codifica per la zona transmembranosa.

L'exó 16 separa la zona transmembranosa del domini tirosina quinasa (13), és la zona anomenada jxtamembranosa i conté diversos llocs de fosforilació en tirosines i serines. Aquesta regió és essencial per la transmissió del senyal (14). Els exons 17-21 codifiquen pels aminoàcids relacionats amb l'activitat tirosina quinasa, i per últim l'exó 22 codifica per l'extrem COOH-terminal de la subunitat (13) (**figura 3**).

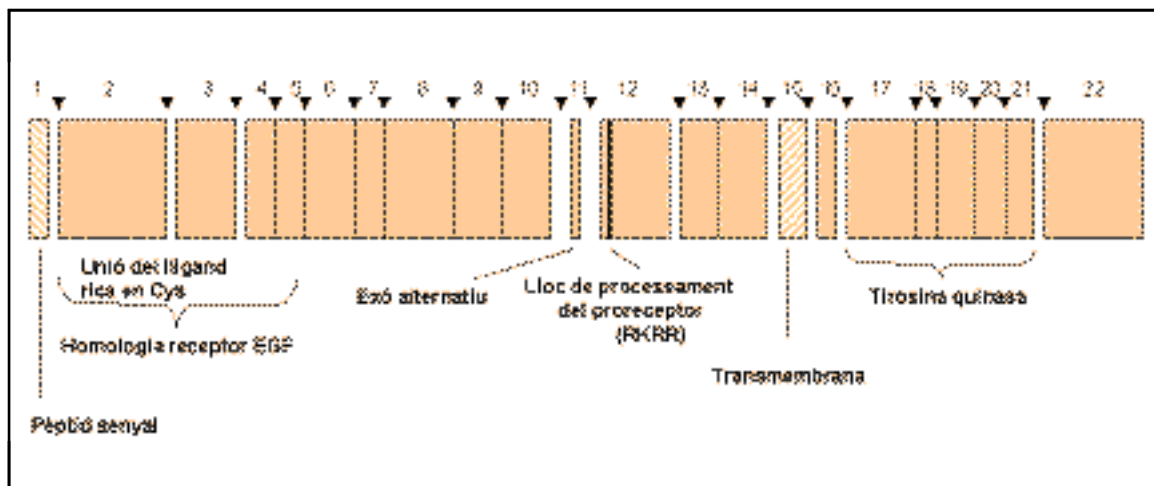


Figura 3.- Esquema dels exons del gen del receptor d'insulina i dels possibles dominis proteics. La posició dels introns està indicada per puntes de fletxa. La numeració dels exons està entre els introns. La seqüència d'aminoàcids consens del lloc de processament està indicada segons el codi aminoacídic d'una sola lletra. EGF: Epidermal Growth Factor.

2.4.3.- PROCESSAMENT ALTERNATIU

Degut a un processament alternatiu de l'exó 11 sorgeixen dues isoformes de receptor, exó-11 o HIR-A i exó+11 o HIR-B (13). L'expressió d'aquestes dues isoformes està regulada de forma teixit-específica (15) i l'afinitat d'aquests dos tipus de receptor per la insulina és diferent. La seqüència d'aminoàcids codificada per l'exó 11 afecta negativament l'afinitat d'unió del receptor per la insulina (8,13).

2.4.4.- REGIÓ PROMOTORA 5'

La regió 5' promotora d'aquest gen és similar als promotors del gens que s'expressen constitutivament (housekeeping genes), molt ric en G+C i sense la seqüència TATA (12,13). La major part de l'activitat promotora s'ha localitzat en aquesta regió rica en G+C que conté múltiples llocs pel factor de transcripció Sp1, encara que aquests llocs no semblen ser els determinants de l'expressió teixit-específica del gen del receptor, ja que els nivells d'aquest factor en els teixits tradicionalment considerats diana com són el fetge, el teixit adipós i el múscle, són molt baixos. El reconeixement de la caixa CAAT pot ser duta a terme per diferents factors transcripcionals com són la família C/EBP (enhancer binding protein) i la família NF-1 (nuclear factor 1), els llocs d'unió d'aquests últims sembla que no són actius com a potenciadors (enhancers) per ells mateixos, sinó que poden estimular la transcripció quan s'associen a un segon lloc d'unió. Aquest segon lloc d'unió podria ser el del C/EBP ja que és molt pròxim, això podria representar que l'especificitat tissular vindria donada pel lloc C/EBP i que aquesta activitat estaria potenciada pel NF-1. D'altres factors de transcripció identificats són els IRNF-1 i 2 (insulin receptor nuclear factors 1 i 2) i els GREs (elements de resposta als glucocorticoids). L'expressió del gen del receptor d'insulina també està regulada per diferents hormones com són els glucocorticoids, la vitamina D i les catecolamines, les dues primeres actuarien directament a través d'elements de resposta situats en el promotor, mentre que les catecolamines actuarien mitjançant l'adenilat ciclase a través de la interacció dels elements CREB (proteïnes que s'uneixen a l'element que respon a l'AMPc) amb els CRE (element que respon a l'AMPc) en el promotor (13).

2.4.5.- REGIÓ 3'

A la regió 3' terminal del gen s'han identificat diferents punts de poliadenilació, això podria explicar en part les múltiples espècies d'ARNs (2,8 Kb - 11 Kb) que es detecten segons el grup cel·lular estudiat, encara que el significat d'això no es coneix (12,13).

2.5.- MECANISME D'ACCIÓ DE LA INSULINA

Un cop la insulina és alliberada per la cèl·lula pancreàtica, aquesta s'uneix al seu receptor a la superfície de gairebé tots els tipus cel·lulars. Mentre la insulina no està unida al seu receptor, la subunitat β exerceix un efecte negatiu sobre l'activitat tirosina quinasa ja que en experiments on s'elimina la subunitat β , per digestió enzimàtica o mitjançant mutagènesis, s'observa una activació constitutiva de la tirosina quinasa (16-18).

2.5.1.- SUBUNITAT- α / UNIÓ AL RECEPTOR

El mecanisme i els punts d'unió de la insulina al seu receptor no són del tot clars. En la subunitat α s'han identificat dos dominis globulars que contenen cinc motius estructurals repetitius, compostos d'hèlix α , girs β i estructures hipervariables, que envolten un domini ric en Cys (19). Aquests dominis són el L1 (aminoàcids 1-119), i els motius conservats consten d'una Gly central més diversos aminoàcids hidrofòbics (Hidr-Xaa-Xaa-Hidr-Xaa-Hidr-Hidr-Xaa-Gly, Xaa indica qualsevol aminoàcid, Hidr indica aminoàcids hidrofòbics), el domini ric en Cisteïnes (aminoàcids 155-312) determinaria l'especificitat pel lligand (20) i el domini L2 (aminoàcids 311-428) on també es troben motius de Gly (21). Els requeriments estructurals, del receptor d'insulina, pel domini d'unió de la insulina són:

- ▶ similitud amb el domini COOH-terminal de la cadena B de la insulina.
- ▶ la presència de dos o més residus aromàtics (Phe o Tyr).
- ▶ la regió ha de ser hidrofòbica.
- ▶ hauria de tenir una conformació de làmina β .

Els aminoàcids 83-95 en l'exó 2 del receptor semblen complir aquests requeriments, d'aquests residus la Phe89 sembla ser crítica per la unió (22). Una altra regió que també sembla complir aquestes condicions són els aminoàcids 1-68 (23).

Una altra regió associada a la unió de la insulina és la formada pels residus 450-601 (aquesta regió forma el domini immunogènic major) (24).

Tot i que els ponts disofre entre la Cys647 i la Cys872 estableixen les interaccions entre les dues subunitats (25), la unió de la insulina activa el receptor mitjançant un mecanisme semblant al d'alguns receptors monomèrics (especialment el de la hormona de creixement): la dimerització de subunitats de receptor adjacents, un cop s'ha unit el seu lligand, dóna lloc a l'activació de la tirosina quinasa associada (26-28). Encara que les molècules de receptor d'insulina estan covalentment lligades durant la seva biosíntesi i el processament, la unió de la insulina aparentment modificaria el dímer de subunitats les

quals mediarien la trans-autofosforilació entre les subunitats (29). En l'estat basal la distància entre aquestes dues subunitats deu ser massa gran perquè es produeixi l'autofosforilació creuada, la unió del lligand permetria apropar-les i el canvi conformacional destaparia la Tyr1162 del lloc catalític. Quan es dona l'activació els dos llocs catalítics de les dues subunitats s'orienten en juxtaposició donant-se una activació creuada (25)

Un model conceptual per explicar aquest mecanisme és que cada subunitat conté els dos dominis diferents (L1 i L2) d'unió a la insulina al voltant del domini ric en cisteïnes. L'exó 2 codificaria pel domini anomenat lloc 2, i els exons 6 i 7 composarien el lloc 1 (30). Aquestes dues regions intervenen d'una manera independent a la unió de la insulina. Així mateix la pròpia insulina té dos llocs d'unió al receptor. Aquests dos llocs d'unió tant en el receptor com en la insulina medien una unió creuada entre les subunitats covalentment unides, de manera que quan la molècula d'insulina s'uneix modifica el receptor dimeritzat covalentment (25,30). Aquest canvi conformacional degut a la unió de la insulina és el que media la trans-fosforilació entre les subunitats (29).

Un altre estudi ha suggerit que els aminoàcids 704-717 (en l'exó 10) en l'extrem COOH-terminal de la subunitat també representa un punt de contacte per la unió de la insulina (31).

2.5.2.- SUBUNITAT- β / ACTIVACIÓ DEL RECEPTOR

Tal com s'ha dit perquè es doni lloc l'activació del receptor s'han de produir diferents fosforilacions.

2.5.2.1.- FOSFORILACIÓ EN TIROSINES

La fosforilació es dona en residus de tirosina ubicats en diferents regions de la subunitat. En la regió jxtamembranosa es troba la Tyr972. Aquest residu és important per la transmissió del senyal, ja que sembla que és el que media la fosforilació dels substrats IRS-1 (insulin receptor substrate-1) i Shc, encara que s'ha vist que no és imprescindible per l'activitat tirosina quinasa del receptor (32,33). Aquesta Tyr972 es fosforila molt dèbilment o gairebé gens en resposta a la insulina, cosa que suggereix que deu actuar com a punt de contacte per substrats intracel·lulars (34). En la regió reguladora hi ha la Tyr1158, Tyr1162 i Tyr1163, les quals tenen un paper clau en el procés d'autofosforilació i en l'activació de la quinasa. Abans de la fosforilació la Tyr1162 bloqueja el lloc actiu inhibint l'accés a substrats potencials. El canvi conformacional produït per l'enllaç de la insulina deu desbloquejar el lloc ocupat per la Tyr1162 permetent la unió de l'ATP i la transfosforilació. Aquesta posició és conservada en tots els receptors

tirosina quinasa, suggerint una funció autoinhibidora comú (35). S'ha suggerit també que la regió reguladora deu poder unir proteïnes SH₂ a través de l'associació d'aquestes amb la Tyr1158 (36).

La forma trifosforilada és la forma activa, mentre que la mono o bi-fosforilada és molt menys activa. El domini tirosina quinasa té una seqüència consens en la regió dels aminoàcids 1003-1030, en la qual la Lys1030 té un paper fonamental, ja que la modificació d'aquest residu aboleix l'activitat tirosina quinasa (34). Els aminoàcids 1131-1137 componrien el loop catalític d'aquest domini (21) i els aminoàcids 1149-1170 conformarien el loop d'activació (37) que un cop hi ha l'autofosforilació es reorganitza i facilita la orientació dels dos extrems de la tirosina quinasa, necessari per la unió de l'ATP.

A l'extrem COOH-terminal trobem la Tyr1328 i la Tyr1334. Aquesta regió sembla tenir un paper regulador en la senyalització (29). També s'ha vist que aquest domini pot unir la proteïna Grb-10 que modula l'efecte mitogènic de la insulina (34). L'activitat tirosina quinasa del receptor és crucial per l'acció de la insulina (1,29).

2.5.2.2.- FOSFORILACIÓ EN SERINES / TREONINES

En la subunitat del receptor es troben la Ser967 i la Ser968 en la regió jxtamembrana i la Ser1305 i la Ser1306 i la Thr1348 en el domini COOH-terminal que esdevenen fosforilades sota determinades condicions (l'activació de la Proteïn Kinasa C (PKC), en presència d'esters de forbol, en presència d'agents que actuen a través de l'AMPc, etc). La significació d'aquestes fosforilacions no és clara, mentre que alguns autors mantenen que la fosforilació en Ser i Thr inhibiria la fosforilació de Tyr en el propi receptor (disminuint així l'efecte estimulador de la insulina) (38), d'altres suggereixen que la relació entre la fosforilació en Ser/Thr i l'activitat tirosina quinasa del receptor és menys transcendent (39).

2.5.3.- SUBSTRATS INTRACEL·LULARS

La via de senyalització de la insulina passa per una complexa xarxa tramada per un nombre de substrats intracel·lulars que actuen com a segons missatgers. Les interaccions entre aquestes proteïnes i el receptor, i els diversos camins que segueix el senyal per donar lloc a les diferents accions ha estat i és encara un laberíntic tema d'estudi.

Utilitzant tècniques d'immunoprecipitació amb anticossos antifosfotirosina, en cèl·lules d'hepatoma estimulades amb insulina, es va detectar una proteïna que es va anomenar inicialment pp185 (basat en la migració en SDS-PAGE) (40), evidenciant l'existència de substrats cel·lulars del receptor d'insulina. Aquesta proteïna, el primer

substrat clonat del receptor d'insulina (IRS-1), té un pes molecular estimat de 131 KDa, la lentitud de migració en el SDS-PAGE és degut al seu alt nivell de fosforilació (41,42). Posteriorment s'han trobat d'altres proteïnes de la mateixa família i s'han anomenat IRS 2, 3 i 4.

L'IRS 1 té un domini homòleg a la plekstrina (PH) en el seu extrem NH₂-terminal. Aquest domini pot unir fosfolípids i es troba en moltes proteïnes relacionades amb la senyalització intracel·lular que necessiten associar-se a la membrana cel·lular per actuar, com són Sos, PKB, -ark, etc (34). L'IRS1 també té un domini d'unió a fosfotirosines (PTB); aquests dominis són importants en la interacció entre molècules senyalitzadores amb motius tirosina fosforilats. El domini PTB interacciona amb el motiu NPXY del receptor d'insulina situat a la subunitat permetent la unió al receptor i la seva fosforilació. La Tyr972 localitzada en el motiu de reconeixement NPXY del receptor, no necessita estar fosforilada per unir els dominis PTB, això explica perquè aquesta tirosina del receptor no es troba fosforilada en cèl·lules intactes, encara que és clau per unir i fosforilar els seus substrats (34). L'IRS 1 té uns 20 punts de fosforilació potencials en Tyr, incloent 6 motius YMXM i 3 motius YXXM. Al menys 8 tirosines es fosforilen en resposta de l'activació del receptor. També té unes 30 Ser/Thr en seqüències consens de fosforilació per serín/treonín quinases. L'IRS-1 té un nivell basal de fosforilació en serines molt alt, i és ràpidament fosforilat en treonines i serines en resposta a la insulina (41,42).

Es creu que la regulació del senyal de la insulina a través de les Ser/Thr quinases és mediada per la fosforilació de proteïnes IRS més que no del propi receptor (34). Es té, doncs, la idea general que les fosforilacions en Tyr actuen d'una manera activadora (transmissora) i per contra les fosforilacions en Ser/Thr actuarien d'una manera inhibidora (apagament del senyal).

Quan l'IRS 1 és fosforilat en Tyr, aquest s'associa a diferents proteïnes que contenen dominis SH2 (Src homology 2) com són la subunitat p85 de la PI3-K (fosfatidilinositol 3-kinasa), la Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) i la tirosín fosfatasa SHP2. L'associació d'aquestes proteïnes amb l'IRS 1 permet l'activació de les mateixes i la transmissió del senyal.

D'altres proteïnes que interaccionen directament amb el receptor són :

- ▶ les Shc (Src homology collagen protein) que es fosforilen en Tyr després de l'estimulació per la insulina i interaccionen amb d'altres proteïnes com la Grb2 via dominis SH2. Aquestes proteïnes estan involucrades en la senyalització mitogènica

mitjançant tirosín quinases com els receptors del NGF (necrosis growth factor), EGF (epidermal growth factor) i PDGF (platelet derived growth factor) (34).

- ▶ les Gab 1 (Grb2-associated binder-1) que són fosforilades en Tyr pel receptor d'insulina i del EGF. Pot unir motius SH2 i això li permet interaccionar amb la subunitat p85 de la PI3K, amb la Grb2 i amb la fosfotirosín fosfatasa SHP2, actuant com un transmissor multifuncional (34).

- ▶ les SIRPs (signal regulatory proteins) / SHPS-1 (SHP substrate 1), són una nova família de proteïnes que també són fosforilades en Tyr pel receptor d'insulina i factors de creixement. S'uneixen als dominis SH2 de la tirosín fosfatasa SHP2, que les defosforila, i també a SHP1 i a Grb2.

2.5.4.- VIES DE SENYALITZACIÓ

Les dues vies de senyalització més importants o millor conegudes són la p42/p44Map quinasa i la PI3 quinasa/PKB. Per una millor comprensió aquestes dues vies seran tractades com vies diferents tot i que no són del tot independents.

2.5.4.1.- P42/P44MAP QUINASA (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE)

Un cop la insulina s'ha unit al seu receptor, s'inicia la propagació de la senyal a través d'una sèrie de fosforilacions i activacions de quinases. Els primers substrats fosforilats en tirosines pel receptor d'insulina són l'IRS1 i Shc. Aquestes tirosines fosforilades són els punts d'unió per Grb2 mitjançant els seus dominis SH2, mitjançant els dominis SH3 aquest (Grb2) s'unirà a la proteïna Sos. Aquest complex Grb2/Sos permet acostar la Sos a la proteïna p21 Ras (petita proteïna G) i activar-la mitjançant un intercanvi de guanines (p21 Ras-GDP → p21 Ras-GTP). L'activació de la Ras dona lloc a una estimulació seqüencial de proteïn quinases citoplasmàtiques com són la Raf-1 un cop associada a Ras té activitat serín/treonín quinasa), la MEK (MAPK ERK-activating kinase) (s'activa mitjançant la fosforilació en serines/treonines per quinases com la Raf-1), i la p42/p44 MAPK (que és activada per la MEK que la fosforila en tirosines i treonines). Un cop activada la MAPK, aquesta pot activar, en serines o treonines, un gran nombre de proteïnes que poden ser associades a membrana, citosòliques o nuclears. Aquestes proteïnes es troben localitzades tant en les primeres fases de la cadena (Sos, Raf-1, MEK, IRS1, etc), per tant podria ser un mecanisme de feedback negatiu, com també es troben en les últimes fases de la cadena (p90 RSK o MAPKAP-kinase 1, MAPKAP-kinase 2, etc) i poden fosforilar factors de transcripció com c-Fos o les proteïnes CREB. A més les MAP quinases poden fosforilar directament diferents proteïnes nuclears com Elk 1, c-Fos, C-Myc, RNA polimerasa II, etc, indicant que les

MAP quinases serien unes reguladores importants de l'activitat transcripcional nuclear. Aquesta via intervé en la proliferació i en la diferenciació cel·lular (34) (**figura 4**).

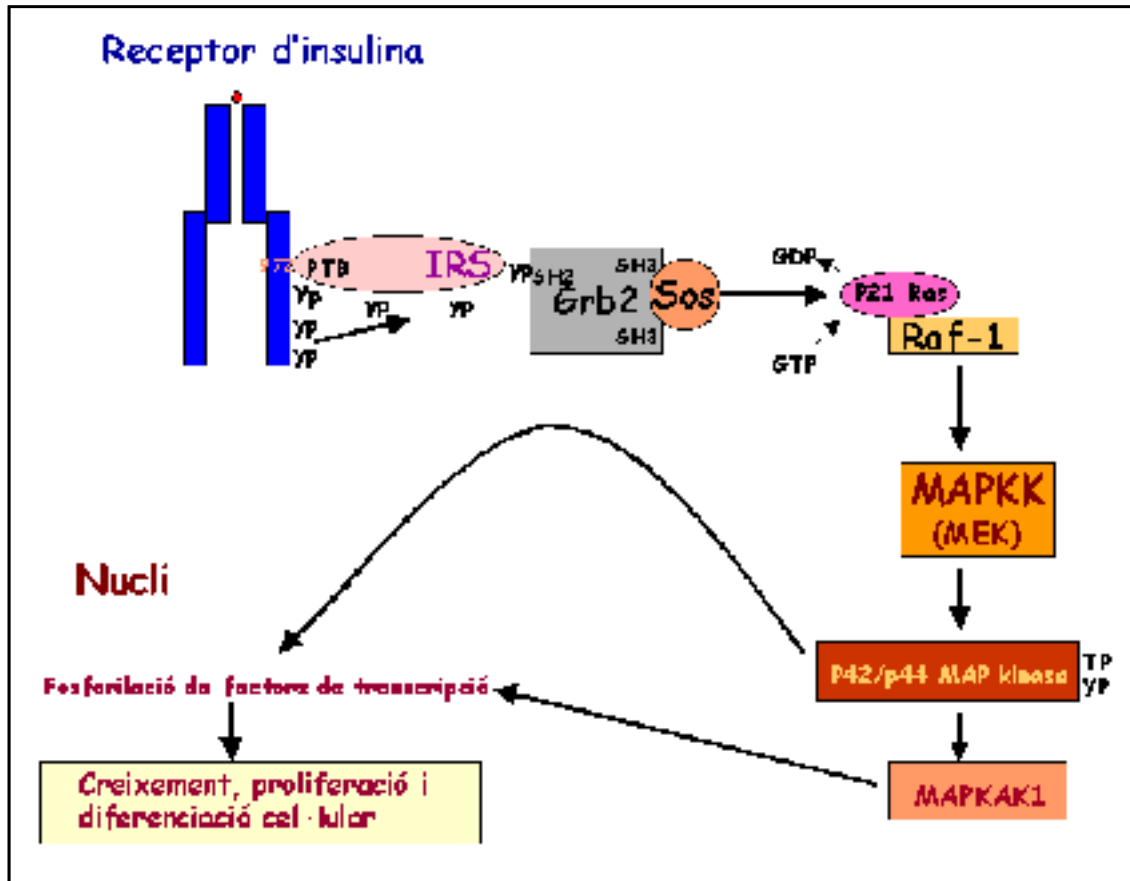


Figura 4.- Representació de la via de senyalització de la insulina-receptor a través de la p42/p44 Map quinasa. Yp: tirosines fosforilades, IRS: substrat del receptor d'insulina, PTB: domini d'unió a fosfotirosines, SH2: Src homology 2, Grb2: growth factor receptor-bound protein 2, Sos: son of sevenless, p21 Ras: petita proteïna G, Raf 1: quinasa, MAPKK (MEK): MAP quinasa quinasa, MAPKAK1: serín/treonín quinasa.

2.5.4.2.- PI3 QUINASA / PKB

La Fosfolinositol 3 quinasa (PI3 quinasa) està composta per una subunitat catalítica (p110) i una subunitat reguladora (p85). La subunitat reguladora s'uneix a l'IRS 1 mitjançant dominis SH2. En resposta a la insulina, l'IRS 1 fosforilat i unit a la p85, estimula l'activitat catalítica de la subunitat p110. Els IRS2 i 3 també són capaços d'activar la PI3 quinasa. La subunitat p110 té dues activitats enzimàtiques: activitat quinasa catalítica i activitat serín quinasa. Aquesta última podria jugar un paper de feedback negatiu en la senyalització de la insulina.

La PI3 quinasa activa la Proteín quinasa B (PKB), serín/treonín quinasa, mitjançant la producció de PdtIns (fosfatidilinositol) (3,4,5)P3 o PdtIns(3,4)P2 que recluten la PKB cap a la membrana. Un cop allí la PKB és el substrat de dues quinases, la PDK1 i la PDK2 (phosphatidyl-dependent protein kinases 1 i 2) que la fosforilen en

treonines i serines respectivament. Un cop fosforilada la PKB es desenganxa de la membrana i pot fosforilar les seves dianes intracel·lulars com són la fructoquinasa-2 (involucrada en el control de la glicòlisi), la GSK3 (que controla la síntesi de glicogen i la iniciació de la traducció del ARNm), i la proteïna Bad (que està relacionada en processos d'apoptosis). També controla l'activitat de la quinasa mTOR que regula la quinasa p70S6. Aquesta via intervé en processos metabòlics i en la síntesi de proteïnes (34) (figura 5).

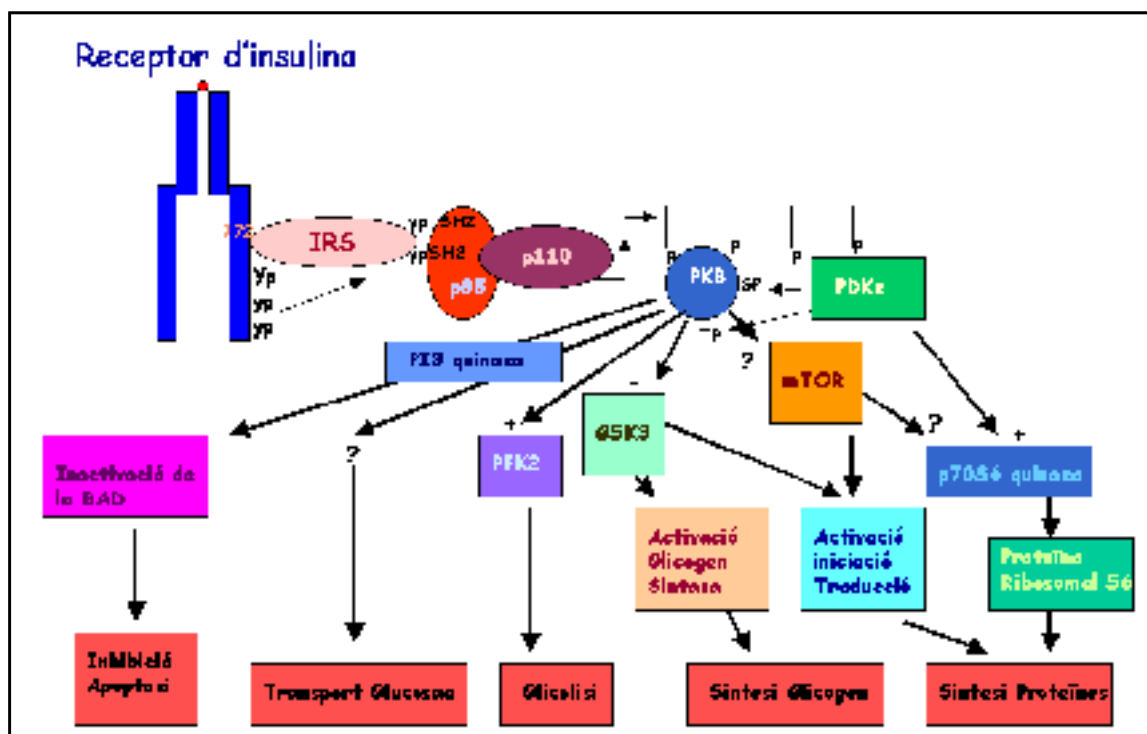


Figura 5.- Representació de la via de senyalització a través de la Fosfoinositol 3 quinasa (PI3K). Yp/Tp/Sp: tirosines/treonines/serines fosforilades, p85/p110: subunitat reguladora i catalítica respectivament de la PI3K, SH2: Src homology 2, PKB: proteïn quinasa B, PDKs: quinases dependents del fosfatidil, mTOR: mammalian target of Rampamycin, GSK3: glycogen syntase kinase 3, PFK2: 6-phosphofructo2-kinase.

2.6.- RESISTÈNCIA A LA INSULINA

2.6.1.- DEFINICIÓ

El concepte de resistència a la insulina ha estat definit d'una manera general com "un estat (d'una cèl·lula, teixit o organisme) en el que és necessària més concentració d'insulina per obtenir una determinada resposta biològica" (43). Això vol dir que la cèl·lula, teixit o organisme té una resposta biològica a l'acció de la insulina més baixa de la normal. La resistència a la insulina pot ser selectiva, implicant només certs aspectes de l'acció de la insulina, un fet que complica tant la definició com la caracterització *in*

vivo o *in vitro*. Actualment, la determinació clínica de la resistència a la insulina (o, inversament, de la sensibilitat a la insulina) es basa en diversos tests, els quals, del més simple al més complex, inclouen la determinació dels nivells d'insulina, a nivell basal o després d'un test de tolerància oral a la glucosa (OGTT), la mesura dels nivells seqüencials de glucosa en plasma després de l'administració d'insulina intravenosa (ITT), l'estimació de l'índex de la sensibilitat a la insulina (Si) aplicant la tècnica del model mínim a les dades obtingudes d'un mostrejat freqüent en un test de tolerància a la glucosa intravenosa (FSIVGTT), i la mesura de la disponibilitat de glucosa mediada per la insulina *in vivo* (M) mitjançant el procediment del clamp euglicèmic hiperinsulinèmic (44).

Encara que la mesura tant del nivell basal com del pic d'insulina després d'un OGTT és un mitjà fàcil i pràctic per classificar els individus segons el grau de resistència a la insulina (en normals, mitjans a moderats i resistents severa a la insulina), el resultat d'aquests tests han de ser interpretats en el context dels nivells plasmàtics de glucosa, ja que la presència de qualsevol grau d'hiperglicèmia suggereix la presència de defectes en la secreció d'insulina i exagera la resistència a la insulina invalidant el grau d'insulinèmia com a índex de la resistència a la insulina (44).

2.6.2.- CONDICIONS I DEFECTES ASSOCIATS A LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA

La resistència a la insulina es dona en diverses anomalies humanes d'etiologia ben diferent. En les síndromes de resistència severa a la insulina, la resistència a la insulina és un determinant important del fenotip clínic. En d'altres patologies, per exemple la Diabetis Mellitus tipus 2, l'obesitat i la intolerància a la glucosa, el grau de resistència a la insulina és menor. En la diabetis i la intolerància a la glucosa, estudis familiars han postulat que aquestes malalties tenen una base genètica. Fins i tot s'ha proposat un paper patològic per la resistència a la insulina en condicions tant dispars com en la Distròfia Miotònica, la insuficiència renal crònica i la cirrosi hepàtica. Per altra banda la significació clínica de l'acció de la insulina en moltes altres anomalies, en cas que hi sigui, és incerta (45) (**taula 1**).

Condicions patològiques associades a la resistència a la insulina.

Condicions adquirides

Excés agut d'hormones contrareguladores (trauma, sepsis severa, infart de miocardi agut, cetoacidosi diabètica)

Certes drogues (corticoesteroids, -bloquejants)

Tirotoxicosis

Feocromocitoma

Síndrome de Cushing

Insulinoma

Síndrome de Glucagonoma

Insuficiència congestiva cardíaca

Malaltia ateromatosa

Angina microvascular

Cirrosi hepàtica

Insuficiència renal crònica

Condicions heretades

Distròfia miotònica

Síndrome de Prader-Willi

Síndrome d'Älstrom

Síndrome de Laurence-Moon-Biedl (Lipodistròfia generalitzada)

Síndrome de Werner

Atàxia de Friedreich

Taula 1.- Condicions patològiques associades a la resistència a la insulina. Taula parcialment extreta de la referència (45) i modificada per l'autor.

En aquestes patologies s'han demostrat defectes en l'acció de la insulina a nivell de receptor i postreceptor. Els defectes a nivell de receptor estan representats essencialment per una disminució en el nombre de receptors en la superfície cel·lular, associada a hiperinsulinèmia i deguda, en general, al mecanisme de regulació negativa del receptor per la insulina (down-regulation).

2.6.2.1.- DIABETIS MELLITUS TIPUS 2

En la resistència a la insulina de la Diabetis Tipus 2 s'ha demostrat que existeixen defectes a nivell de l'activitat tirosina quinasa i se sospita que pot presentar d'altres defectes postreceptor, encara que la naturalesa molecular d'aquests encara és desconeguda. A més de la resistència a la insulina, en la Diabetis Tipus 2, també hi ha defectes en la secreció d'insulina, això fa difícil determinar quin dels dos defectes és el primer. La Diabetis Tipus 2 s'ha classificat com una anomalia multifactorial i heterogènica, per tant qualsevol proteïna involucrada en l'acció o secreció de la insulina és una candidata potencial per a alguna alteració, genètica o no, lligada a la malaltia (46). Tot i que està clar que la majoria de pacients amb de Diabetis Mellitus tipus 2 no presenten mutacions en el gen del receptor d'insulina, O'Rahilly al 1991 i Cocozza al 1992 van descriure alguns pacients amb mutacions en aquest gen (47,48). Encara que presentar mutacions en aquest gen, no és una característica comú, s'ha estimat que aproximadament un 1% d'aquests pacients podrien presentar-ne (49).

2.6.2.2.- OBESITAT

La distribució del teixit adipós en l'obesitat, també afecta a l'acció de la insulina (50). L'obesitat de la part superior del cos (androide), i en particular la deposició visceral del greix (indicada per una relació cintura:cadera elevada), està molt més associada amb la intolerància a la glucosa i amb d'altres característiques de resistència a la insulina que la disposició del teixit adipós en la part inferior del cos (ginecoid) (50). En certes poblacions on la incidència de Diabetis Mellitus tipus 2 és molt alta (Indis Pima, Americans mexicans, Sud asiàtics) els individus estan predisposats a l'obesitat abdominal.

2.6.2.3.- INTOLERÀNCIA A LA GLUCOSA

La intolerància a la glucosa i la diabetis estan ben definides al practicar un test de tolerància oral a la glucosa. La intolerància a la glucosa sovint és un estat de transició cap a la Diabetis Mellitus tipus 2.

Al 1988 en Gerald Reaven a partir de diferents línies experimentals i epidemiològiques va postular que la resistència a la insulina i la hiperinsulinèmia afectaven el desenvolupament i el curs clínic de tres anomalies relacionades molt importants: la Diabetis Tipus 2, la hipertensió i la malaltia vascular coronària (51). Reaven va observar que un determinat grup de pacients amb resistència a la insulina mostraven un conjunt de defectes metabòlics claus que eren factors de risc per la malaltia vascular coronària anomenant aquesta agrupació síndrome X (51).

2.6.3.- SÍNDROMES ASSOCIADES A LA RESISTÈNCIA SEVERA A LA INSULINA

Les característiques clíniques associades amb la resistència severa a la insulina inclouen l'acantosis nigricans (consistent en una hiperpigmentació i hiperqueratosi de la pell normalment en els plecs axilars, clatell i ingles), i l'evidència d'hiperandrogenisme ovàric en noies post-puberals, incloent hirsutisme, oligoamenorrea i infertilitat (45).

Totes les síndromes de resistència a la insulina severa comparteixen alguna d'aquestes característiques. La característica més comú és l'hiperinsulinisme, resultat d'un increment en la secreció d'insulina per compensar la resistència perifèrica a la insulina (52).

A més la intolerància a la glucosa o la Diabetis Mellitus franca, encara que no sempre, es poden donar en els últims estadis del curs d'aquestes síndromes (52).

Cada una d'aquestes síndromes presenten característiques úniques que les defineixen, així s'ha pogut fer una classificació dels pacients amb resistència a la insulina severa segons el seu fenotip (**taula 2**).

Síndromes associades a la resistència extrema a la insulina.

Anticossos anti-receptor d'insulina

Resistència a la insulina Tipus B

Mutacions en el gen del receptor d'insulina

Leprechaunisme

Síndrome de Rabson-Mendenhall

Resistència a la insulina Tipus A

D'altres

Lipodistròfia

Resistència a la insulina Tipus C

Resistència a la insulina associada a acromegaloidisme

HAIR-AN (Hiperandrogenisme, Resistència a la insulina, Acantosis Nigricans)

PCOS (Síndrome de l'Ovari Poliquístic)

Taula 2.- Síndromes associades a la resistència extrema a la insulina. Taula parcialment extreta de la referència (45) i modificada per l'autor.

2.6.3.1.- ANTICOSSOS ANTI-RECEPTOR D'INSULINA

Els pacients afectes de resistència a la insulina Tipus B, no ho manifesten fins a la mitjana edat. Afegit a les característiques típiques de la resistència a la insulina severa (homeostasi anormal de la glucosa, acantosis nigricans, hiperandrogenisme ovàric) sovint estan associades a altres patologies autoimmunes. Aquests pacients poden presentar hipoglicèmies en dejú o poden desenvolupar hiperglicèmies durant el curs de la seva malaltia, fins i tot subseqüent al període d'hiperglicèmia i diabetis. Juntament amb dades de laboratori no específiques com poden ser la velocitat de sedimentació d'eritròcits elevada, leucopènia, hipergammaglobulinèmia, anticossos antinuclears en sèrum, i proteinúria, aquests pacients mostren la presència d'anticossos anti-receptor d'insulina (anti-RI) en plasma. Normalment la quantitat d'anticossos anti-RI està en proporció a la magnitud de la resistència a la insulina. Aquests anticossos són la marca diagnòstica per aquest tipus d'anomalia. Aquests anticossos probablement són el resultat o de la pèrdua de la tolerància immunològica o a la generació d'una resposta autoimmune cap a un antigen exògen i a la formació d'autoanticossos a través d'una mimicitat molecular. Aquests anticossos poden donar resistència a la insulina mitjançant interferència estèrica amb la unió de la insulina, encara que alguns anticossos anti-RI semblen activar al receptor, cosa que explicaria la hipoglicèmia que es pot donar en aquests pacients (52).

2.6.3.2.- MUTACIONS EN EL GEN DEL RECEPTOR D'INSULINA

Diferents síndromes amb resistència extrema a la insulina poden ser degudes a modificacions estructurals o funcionals del receptor d'insulina (53). El paper del receptor d'insulina va ser demostrat per la significant reducció en el nombre o en l'afinitat d'aquests receptors per la insulina en alguns pacients. També es van observar anomalies en l'activitat tirosina quinasa així com en el cicle de síntesi i reciclatge dels receptors.

Trobem tres síndromes:

2.6.3.2.1.- LEPRECHAUNISME

El Leprechaunisme va ser descrit al 1954 per WL Donohue i es caracteritza per presentar un sever retard de creixement tant intrauterí com post-natal i la dificultat per sobreviure, lipoatròfia, característiques dismòrfiques (ulls globulars, orelles llargues i micrognàcia), i acantosis nigricans (43,54). Aquests infants tenen una hiperinsulinèmia molt important, sovint associada a la intolerància a la glucosa o a la Diabetis Mellitus franca, a més a més d'hipoglicèmia en dejú (43,54). Addicionalment, les nenes afectades acostumen a tenir hirsutisme i clitoromegàlia, mentre que els nens afectes presenten un engrandiment del penis (43,54). D'altres característiques d'aquesta síndrome inclouen pulmons dismòrfics, malalties renals i hiperplàsia de pit (43). Molt pocs d'aquests nens viuen més enllà del primer any de vida, encara que algun ha sobreviscut fins l'adolescència (43,54). S'ha estudiat el receptor d'alguns d'aquests pacients a nivell molecular i s'ha observat que la majoria són homozigots o heterozigots compostos per mutacions en la regió extracel·lular del receptor (55). S'han trobat alguns casos on la segona mutació no ha pogut ser detectada. Estudis de l'expressió del ARNm han suggerit que hi deu haver una mutació que actua en *cis* i que inhibiria l'expressió d'aquest al·lel (56,57) S'han descrit alguns pacients que presenten mutacions d'aturada en aquest gen, i també un que presenta una deleció total del receptor d'insulina (58). Aquests individus representants del fenotip nul pel receptor d'insulina, no presenten diferències clíniques importants dels altres pacients afectes de Leprechaunisme, cosa que suggereix que a nivell genètic el Leprechaunisme es pot definir com l'absència o gairebé absència d'un receptor d'insulina funcional (59).

2.6.3.2.2.- SÍNDROME DE RABSON-MENDENHALL

Aquesta síndrome va ser primerament descrita el 1950 per Mendenhall (43,60) i actualment es coneguda com la síndrome de Rabson-Mendenhall. Aquests pacients presenten a la infància una resistència a la insulina molt severa i Diabetis Mellitus (normalment refractària a les altes dosis d'insulina), acantosis nigricans, dentició i ungles anormals, una línia de creixement accelerada, pseudopubertat precoç i hiperplàsia pineal (43,60). El pronòstic és generalment pobre degut al desenvolupament de complicacions microvasculars severes associades a la diabetis (43). A nivell molecular tots els pacients estudiats són homozigots o heterozigots compostos per mutacions en el gen del receptor d'insulina. Les mutacions trobades en aquest tipus de pacients no són tan severes com les trobades en pacients amb Leprechaunisme. Per tant a nivell genètic la síndrome de Rabson-Mendenhall es dona quan les mutacions comporten un defecte sever en el funcionament normal del receptor, però aquest no perd totalment la seva funcionalitat (59).

2.6.3.2.3.- RESISTÈNCIA A LA INSULINA TIPUS A O DE KAHN

El terme Síndrome genètic Tipus A es va aplicar originàriament a noies adolescents no obeses amb resistència a la insulina severa, acantosis nigricans, hiperandrogenisme ovàric sever, i la unió de la insulina al seu receptor en leucòcits disminuïda (53). Actualment s'aplica tant per noies com per nois amb resistència a la insulina heretada severa i acantosis nigricans, en absència d'autoanticossos anti-RI. Les noies post-puberals presenten un excés d'andrògens d'origen ovàric, que va des de l'hirsutisme, acné o oligomenorrea a la infertilitat i a una virilització franca amb elevats nivells de testosterona (43,61). A nivell molecular s'han trobat mutacions en heterozigosi, simple o composta, en les dues subunitats del receptor d'insulina, però quan la mutació es troba en la subunitat β , majoritàriament en el domini tirosina quinasa, aquesta s'hereta de manera dominant. El grau de resistència a la insulina associat a aquests pacients és menor que en els Leprechaunismes o en els Rabson-Mendenhall, això probablement fa que aquesta síndrome es presenti de forma més tardana i sigui menys severa (59). D'altres defectes post-receptor en la senyalització de la insulina podrien ser la causa de la resistència a la insulina en aquest tipus de pacients.

En aquestes síndromes les mutacions es poden trobar al llarg de tot el receptor, i no és freqüent que es repeteixin. Tot i això s'han descrit mutacions que s'ha trobat en pacients de diferents síndromes de resistència a la insulina extrema. Això reflecteix algunes de les dificultats d'imposar una classificació estricta del que essencialment és un continu en la disfunció del receptor d'insulina (59).

2.6.3.3.- D'ALTRES SÍNDROMES ASSOCIADES A RESISTÈNCIA SEVERA A LA INSULINA

La Lipodistròfia comprèn un grup heterogeni caracteritzat per la resistència severa a la insulina i associat a hipertriglicèridèmia severa que dona lloc a pancreatitis i a una infiltració de greix en el fetge donant lloc a cirrosi (43,61). Aquestes síndromes han estat classificades segons l'extensió i localització de la distròfia i segons l'edat en la que es presenta (7,61). En general totes presenten manca de teixit adipós, de forma generalitzada o en determinades àrees del cos, intolerància a la glucosa o diabetis, un creixement accelerat, pubertat precoç, hipertròfia muscular i hipertriglicèridèmia (43).

La resistència a la insulina Tipus C se solapa amb la Tipus A, encara que el defecte és post-receptor (45) i no hi ha alteracions en el receptor.

El terme HAIR-AN (HiperAndrogenisme, Resistència a la insulina, Acantosis Nigricans) s'ha aplicat a dones que presenten les anteriorment citades característiques, i sovint va associat a l'obesitat (61).

La síndrome de l'ovari poliquístic presenta com a característica juntament amb l'hiperinsulinisme, quists en els ovaris que poden produir un excés d'andrògens. No és clar si aquestes síndromes representen una entitat diferent de les altres síndromes de resistència a la insulina o no (61).

Per últim la Resistència a la insulina severa associada a l'acromegaloidisme (46) presenta com a particularitat característiques que recorden a l'acromegàlia, incloent cares tosques i engrossiment dels ossos, encara que l'eix GH-IGF-I sembla ser normal.

2.6.4.- CLASSIFICACIÓ DE LES MUTACIONS EN EL GEN DEL RECEPTOR D'INSULINA

Les primeres mutacions en el gen del receptor d'insulina van ser identificades al 1988 per Kadowaki i cols. (62) i per Yoshimasa i cols. (63). Des de llavors s'han descrit més de 90 mutacions en aquest gen.

Aquestes mutacions s'han classificat o dividit en cinc categories o classes segons l'efecte que tenen sobre el cicle de vida normal d'un receptor (64) (**figura 6**).

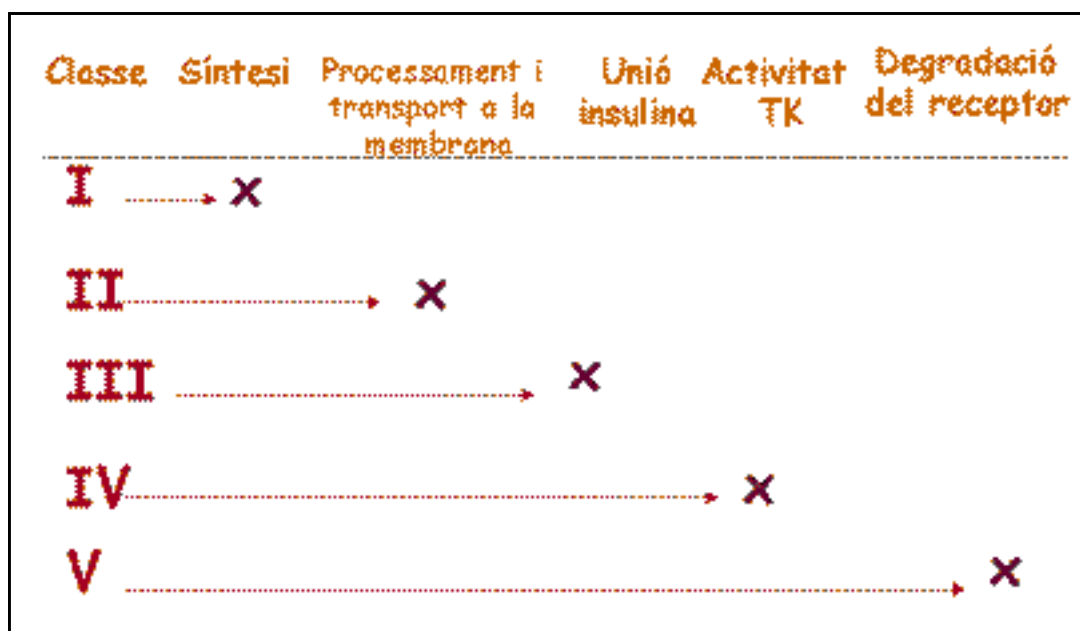


Figura 6.- Classificació de les mutacions en el receptor d'insulina segons l'efecte que exerceixen sobre la via de síntesi, processament, funció i degradació naturals del receptor.

2.6.4.1.- MUTACIONS DE CLASSE I

Aquestes són les que afecten a la velocitat de biosíntesi del receptor fent-la disminuir, poden ser subdividides en dos grups:

2.6.4.1.1.- MUTACIONS QUE INTRODUEIXEN UN CODÓ D'ATURADA PREMATUR

S'han identificat diverses mutacions que impedeixen la biosíntesi del receptor mitjançant la introducció d'un codó d'aturada prematur en el gen del receptor d'insulina. Això es pot donar degut a una mutació sense sentit (nonsense mutation) o bé degut a una deleció que causa un corriment en la pauta de lectura i introdueix un codó d'aturada. Aquestes mutacions donen lloc a una disminució dels nivells d'ARNm (65). El mecanisme que produeix aquest fet no és del tot clar però se l'ha anomenat "disminució dels nivells de ARNm degut a mutacions d'aturada" (nonsense mediated mutations mRNA decay) (66). Si aquestes mutacions es donen *up stream* del domini transmembrana, el receptor truncat no serà expressat en la membrana cel·lular (67). Si

es donen aquests tipus de mutacions en la regió intracel·lular del receptor (exons 16-22), es preveu que aquest receptor es pugui expressar en la membrana cel·lular, tot i que la transducció del senyal a través d'ells pot estar alterada (67).

2.6.4.1.2.- D'ALTRES MUTACIONS QUE ACTUEN EN *CIS* I QUE NO ALTEREN LA SEQÜÈNCIA AMINOACÍDICA DEL RECEPTOR

Les mutacions que disminueixen els nivells d'ARNm donen lloc a una disminució en la velocitat de la biosíntesi del receptor i a la disminució en el número de receptors expressats en la membrana. Aquest tipus de mutacions disminueixen els nivells del ARNm del receptor d'insulina disminuint la velocitat de síntesi, o disminuint l'estabilitat (21). El cas extrem d'aquesta situació és la deleció total de receptor (58). En d'altres mutacions d'aquest tipus, la seqüència codificant per la proteïna no està alterada per la mutació. El prototipus d'aquestes mutacions es va descriure en un pacient amb la síndrome de Leprechaunisme, en el que es va identificar una mutació sense sentit en l'al·lel patern, que disminuïa els nivells de ARNm, mentre que en l'al·lel matern no es va poder identificar cap mutació, tot i que els nivells de ARNm provinents d'aquest al·lel també estaven disminuïts tant en el pacient com en la mare (67). Encara que la possible mutació no s'ha pogut identificar, sembla que aquesta actuaria disminuint els nivells d'ARNm a través d'un mecanisme d'actuació en *cis*. És possible que la mutació resideixi en un element regulador de la transcripció d'aquest gen (21). S'han descrit d'altres pacients amb nivells d'ARNm disminuïts degut possiblement a una mutació no identificada que actuaria en *cis* (57,58)

2.6.4.2.- MUTACIONS DE CLASSE II

Aquestes mutacions impedeixen el transport del receptor a través del Reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi cap a la membrana, amb la consegüent disminució del nombre de receptors expressats a la superfície cel·lular (67). De vegades els receptors amb aquestes mutacions poden "lliscar o colar-se" cap a la membrana, encara que no implica que el seu funcionament sigui normal, poden tenir disminuïda l'afinitat per la insulina, cosa que inhibeix l'habilitat de la insulina d'activar la funció enzimàtica tirosina quinasa del receptor (67). Aquests defectes associats a la funcionalitat del receptor concorden amb la hipòtesi que la mutació distorsiona la conformació normal del receptor i així impedeix la seva funcionalitat (21).

2.6.4.3.- MUTACIONS DE CLASSE III

Aquestes són les que disminueixen l'afinitat del receptor per la unió de la insulina. Els exons i dominis responsables de la unió de la insulina es troben en la regió NH₂-terminal del receptor, per tant es pot predir que mutacions que canvïïn la seqüència aminoacídica en aquesta regió, poden alterar la conformació del lloc d'unió de la insulina canviant així l'afinitat (21).

2.6.4.4.- MUTACIONS DE CLASSE IV

La unió de la insulina al seu receptor inicia la cascada de fosforilacions, tant del propi receptor (autofosforilacions en les tirosines 972,1158,1162,1163,1328 i 1334), com de proteïnes substrat intracel·lulars (a través de l'activitat enzimàtica tirosina quinasa del receptor) que transmeten el senyal cap al nucli. En la subunitat també s'hi troba el lloc d'unió de l'ATP que inclou els aminoàcids 1003-1030, i té un motiu característic (Gly-X-Gly-X-X-Gly-X₂₁-Lys) conservat en totes les proteïna quinases. Anomalies en la unió de l'ATP, que és el donador de fosfats per la tirosina quinasa, impediria aquesta funció enzimàtica. Uns cent aminoàcids corrent avall del lloc d'unió de l'ATP, hi ha un altre motiu molt conservat (Arg-Asp-Leu-X₁-X₂-X₃-Asn) que s'ha identificat com la zona catalítica (catalític loop) que participa en la catalització de la transferència de fosfats i en la determinació de l'especificitat de substrats. S'han descrit una sèrie de mutacions que inhibeixen aquesta activitat tirosina quinasa, inhabilitant al receptor per transmetre el senyal iniciat per la unió de la insulina. Aquestes observacions donen suport a la hipòtesi que l'activitat tirosina quinasa té un paper imprescindible en l'acció de la insulina (21).

2.6.4.4.1.- EFECTE DOMINANT NEGATIU DE LES MUTACIONS EN EL DOMINI TIROSINA QUINASA

Una mutació en heterozigosi simple en el domini tirosina quinasa del receptor d'insulina pot causar resistència a la insulina. Així doncs sembla ser que les mutacions en el domini tirosina quinasa causen resistència a la insulina d'una forma dominant (49). Una hipòtesi per explicar aquesta dominància és que seria possible tenir formes oligomèriques híbrides del receptor d'insulina ($2_{wt mut}$), juntament amb formes simètriques mutants i normals ($2_{mut mut}$) i ($2_{wt wt}$) (**figura 7**), i que només les formes simètriques normals retindrien la capacitat enzimàtica tirosina quinasa, mentre que tant les formes híbrides, com les formes simètriques mutants tindrien l'activitat enzimàtica inhibida (69,70).

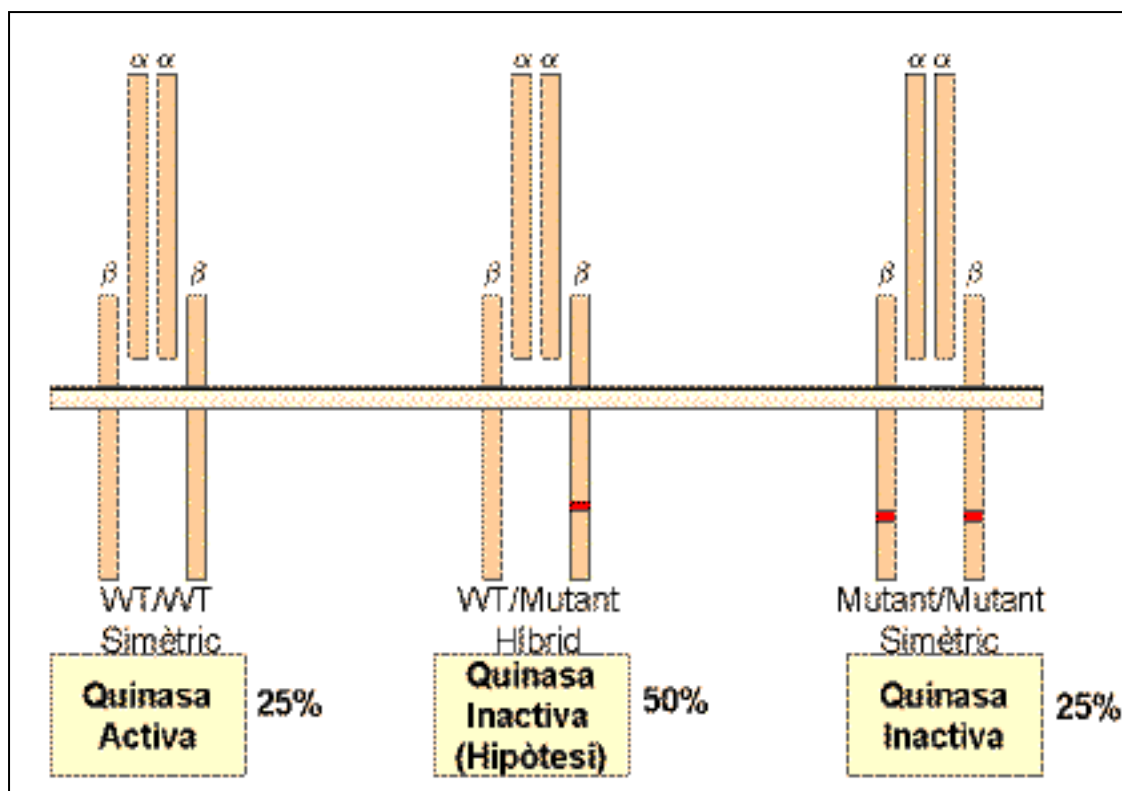


Figura 7.- Representació de la hipòtesi de l'efecte dominant de les mutacions en els dominis tirosina quinasa del receptor d'insulina. La segregació, en el cas d'heterozigosi, és 25% WT/WT (Wild type), 50% WT/Mutant i 25% Mutant/Mutant, de manera que el 75% dels receptors portarien la mutació i per tant tindrien l'activitat enzimàtica inhibida

Per testar aquesta hipòtesi s'han fet diversos estudis de cotransfecció de cèl·lules amb receptors mutats i receptors normals. Treadway i Frattali en el seu estudi van poder detectar formes híbrides mutant/normal de receptors que eren inactives com a tirosina quinases (69,70). Per altra banda el grup de Levy-Toledano no va poder detectar aquests híbrids (71). Aquestes discrepàncies podrien ser degudes a diferències experimentals, a causa de la regulació de l'eficiència en la formació d'híbrids de la cèl·lula hoste (21). Un altre mecanisme per explicar l'efecte dominant negatiu de les mutacions en el domini tirosina quinasa, va ser proposat per Maegawa et al (62). Hi ha mutants que retenen la capacitat d'unir l'IRS 1 (71), això faria possible que els receptors mutats deficients en l'activitat tirosina quinasa poguessin segrestar l'IRS 1, disminuint la seva disponibilitat per ser fosforilats pels receptors normals i així mediar l'acció de la insulina (21).

2.6.4.5.- MUTACIONS DE CLASSE V

Aquest tipus de mutació accelera la velocitat de degradació del receptor dins dels lisosomes. El pH àcid (pH 5.5) dels lisosomes promou la dissociació de la insulina del seu receptor permetent que ambdós (tant l'hormona com el seu receptor) siguin reciclats i reutilitzats. Si no es dona aquesta dissociació, el complex insulina-receptor serà degradat. S'han identificat mutacions en el receptor d'insulina que inhibeixen la capacitat de dissociació de la insulina del seu receptor a pH àcids, incrementant la velocitat de degradació *in vitro* (72) i disminuint el nombre de receptors a la superfície cel·lular degut a la impossibilitat de reciclatge (53).

2.6.5.- MUTACIONS DESCRITES

En la **taula 3** s'esquematitzen les mutacions en el gen del receptor d'insulina descrites i l'efecte d'aquestes.

Pacient	Mutació	Zigotipitat	Classe	Efecte	Autor	Referència
1	Arg1174Gln	Hetero	IV	dism. Activitat TK	H.H.Kilian	Diabetologia (1989) 42:245-249
1	G-A 3385	Hetero	I	Dism mRNA's (17)(17)	H.H.Kilian	Diabetologia (1989) 42:245-249
2	Gly31Arg	Hetero	I		E.R.van der Voorn	Horm. Metab. Res. (1994) 26:599-601
3	Deleció IR	Homo	I	Geniu	E. Wefelheimer	Nature genetics (1993) 5:71-73
4	Arg2728Isp	Hetero	I	Dism mRNA	N. Longo	Am. J. Hum. Genet. (1992) 50:996-1007
4	?	Hetero	I	Dism mRNA	N. Longo	Am. J. Hum. Genet. (1992) 50:996-1007
5	Del 10bp	Hetero	I	Prim. S'incorpora	A. Cama	Hum. Genet. (1985) 95:174-182
5	Asn452Ser	Hetero	V	Accelerat receptor	A. Cama	Hum. Genet. (1985) 95:174-182
6	G-A don. sp. site	Hetero	I	STOP exó 13	J. Magré	Diabetes (1987) 46:1901-1903
7	A-G accep. sp. site	Hetero	I	Aberrant splicing	H. Kadowaki	Biochem. & Biophys. Res. Com. (1987) 237:516-20
7	Del 8 pb	Hetero	I	STOP exó 13	H. Kadowaki	Biochem. & Biophys. Res. Com. (1987) 237:516-20
8	Del 1 pb	Hetero	IV	STOP exó 19	H. Kadowaki	Biochem. & Biophys. Res. Com. (1987) 237:516-20
8	Thr10Met	Hetero	I	processament defectuós	H. Kadowaki	Biochem. & Biophys. Res. Com. (1987) 237:516-20
9	Del 1 pb	Hetero	IV	STOP exó 18	H. Kadowaki	Biochem. & Biophys. Res. Com. (1987) 237:516-20
12	Thr184Ile	Hetero	I		H. Vestergaard	Diabetes (1988) (suppl 1):188
13	No Mutacion	Homo	I	Diam. n° receptor, mRNA	T. Haruta	Metabolism (1995) 44: 430-37
14	No Mutacion	Homo	I	Diam. n° receptor, mRNA	E. Imano	Diabetes (1991) 40: 548-57
15	No Mutacion	Homo	I	Diam. n° receptor, mRNA	E. Imano	Diabetes (1991) 40: 548-57
18	Del 1,2 Kb (incl. exó 14)	Hetero	I	STOP exó 14	F. Shimada	The Lancet (1990) 335:1179-81
17	Del 3pb	Hetero	I	Diam binding	Y. Suzuki	J. Clin. End. & Metab. (1989) 80:1214-20
17	Unfound mutation	Hetero	I	Diam. mRNA	Y. Suzuki	J. Clin. End. & Metab. (1989) 80:1214-20
18	Del exó 3	Hetero	I	STOP exó 4	E. Wefelheimer	J. Clin. End. & Metab. (1984) 78:1153-58
19	Gly1006Val	Hetero	IV	diam. Activitat TK	N. Fukushima	Tohoku J. Exp. Med. (1984) 144: 129-38
20	Del Leu959	Hetero	IV	Normal binding/Diam. act. TK	T. Avata	Diabetes (1992) 41: 93A
21	Recomb exó 17/seq. 0/1u	Hetero	IV	diam. activitat TK	M. Taira	Science (1989) 245: 63-66
22	No Mutacion	Homo	IV	Diam binding i activitat TK	O. Nozaki	J. Jan. Diabetes Soc. (1980) 33: 252
23	Gly1006Val	Hetero	IV	Diam. activitat TK	O. Nozaki	J. Clin. Endocrinol. Metab. (1983) 77:169-172
24	Pro906Leu	Hetero	IV	Diam. activitat TK (75%)	T. Kadowaki	Annual Meeting of the Endocrine Society (1987) 1119
25	Arg735Ser	Homo	IVIII	unleaved precursor	M. Kobayashi	Diabetes (1988) 37:653-656
26	Ala1048Asp	Hetero	IV	Diam. binding i activitat TK	T. Haruta	Diabetes (1993) 42:1837-1844
27	Trp1193Leu	Hetero	V	degradacio accelerada	M. Iwanishi	Diabetologia (1993) 36:414-422

Taula 3.- Mutacions descrites en el gen del receptor d'insulina de diferents pacients (1-77) amb resistència a la insulina i l'efecte que aquestes exerceixen sobre el receptor. (La taula continua en les dues pàgines següents)

Pacient	Mutació	Zigositat	Classe	Efecte	Autor	Referència
28	Glu1179Asp	Hetero	IV	Dism. autoP / Dism N° recept	T. Imamura	J. Jpn. Diabetes Soc. (1994) 37: 197-205
29	Pro193Leu	Homo	III	Dism. binding	K. Egawa	J. Jpn. Diabetes Soc. (1992) 35: 105-112
30	Trp1193Leu	Hetero	III/IV	Dism. binding i activitat TK	T. Imamura	Molecular Diabetology (1993) 4: 71-76
31	Normal cDNA	Homo	III	Dism. binding	M. Kobayashi	J. Clin. Endocrinol. Metab (1988) 66:1084-1088
32	Normal cDNA/Dism. RNA	Homo	III	Dism. Binding	Y. Takata	Metabolism (1986) 35:950-955
33	Pro1178Leu	Hetero	IV	Dism. activitat TK	H. Kim	Diabetologia (1992) 35:261-266
34	Arg786STOP	Homo	I	No receptor a membrana	N. Jospe	Clinical Endocrinology (1996) 45:229-235
35	Arg897STOP	Hetero	I	Dism. binding	S. I. Taylor	Diabetes Care (1990) 13:25-7278
36	Phe382Val	Homo	II	Dism. binding	S. I. Taylor	Diabetes Care (1990) 13:25-7278
37	Gln672STOP	Hetero	I	Dism. binding	S. I. Taylor	Diabetes Care (1990) 13:25-7278
37	Lys460Glu	Hetero	III/IV	Acceleracio degradació	S. I. Taylor	Diabetes Care (1990) 13:25-7278
38	Lys121STOP	Homo	I	No receptor a membrana	A. Krook	Lancet (1993) 342: 277-278
39	Del G Met1109-STOP	Hetero	IV	Dism Activitat TK	H. Kadowaki	Abstract
40	Del 13pb + inser 5pb= del8pb	Homo	I	No receptor a membrana	S. I Taylor	Lancet (1993) 342: 924
41	Asp261 +12aa + Leu262	Hetero	II	Dism. binding	D. Müller-Wieland	Diabetologia (1993) 36: 1168-1174
41	Arg86STOP	Hetero	I	No receptor a membrana	D. Müller-Wieland	Diabetologia (1993) 36: 1168-1174
42	Asn15Lys	Hetero	II	afecta transport/dism. afinitat	T. Kadowaki	J Biol Chem(1990) 265:19143-150
42	Arg1000STOP	Hetero	I	Dism. RNA	T. Kadowaki	J Clin Invest (1990) 86: 254-264
43	Cys274Tyr	Hetero	II	defecte de processament	J.P. Whitehead	Diabetes (1998) 47: 1362-1364
43	Arg1174Trp	Hetero	IV	dism. Activitat TK	J.P. Whitehead	Diabetes (1998) 47: 1362-1364
44	Gly31Arg	Hetero	II	Afecta transport/proces	E.R. van der Vorm	J Biol Chem (1992) 267:66-71
45	Ile119Met	Homo	II		J. Hone	J. Med. Genet. (1994) 31: 715-716
46	Del Asn281	Hetero	IV	activacio TK constitutiva	N. Longo	J. Clin. Endocrinol. & Metab. (1995) 80:1496-1501
46	G-A splice donor	Hetero	III		N. Longo	J. Clin. Endocrinol. & Metab. (1995) 80:1496-1501
47	His209Arg	Homo	II	Processament defectuós	T. Kadowaki	J Clin Invest (1990) 86: 254-264
48	Asn462Ser	Hetero	V	Acceleracio degradació	T. Kadowaki	J Clin Invest (1990) 86: 254-264
48	Trp1335TOP	Hetero	I	Dism. RNA	T. Kadowaki	J Clin Invest (1990) 86: 254-264
49	Val28Ala	Hetero	II	processament defectuós	F. Barbetti	Diabetis (1992) 41: 408-415
49	Gly366Arg	Hetero	II	processament defectuós	F. Barbetti	Diabetis (1992) 41: 408-415
50	Pr193Leu	Homo	II	processament defectuós	P. Carrera	Human Molecular Genetics (1993) 2: 1437-1441
51	Trp412Ser	Homo	II	processament defectuós	E.R. van der Vorm	J Biol Chem (1994) 269:14297-14302
52	Arg252His	Homo	II	processament defectuós	N. Nakashima	J Clin Endocrin. & Metab. (1995) 80: 3662-3667
53	Cys284Tyr	Homo	II	processament defectuós	C. Desbois-Mouthon	Pediatric Research (1997) 42: 72-77

Pacient	Mutació	Zigositat	Classe	Efecte	Autor	Referència
54	Leu233Pro	Homo	II	processament defectuós	M. P. Klinkhamer	The EMBO Journal (1989) 8: 2503-2507
55	Arg86Pro	Homo	III	processament defectuós	N. Longo	Prenatal Diagnosis (1995) 15: 1070-1074
56	Del Asn281	Hetero	IV	activació TK constitutiva	C. Desbois-Mouthon	J Clin Endocrin. & Metab. (1996) 81: 719-727.
56	Del exó 10-13. Stop	Hetero	I	No receptor a membrana	C. Desbois-Mouthon	J Clin Endocrin. & Metab. (1996) 81: 719-727.
57	Glu1179Lys	Hetero	V	Acceleració degradació	C. Desbois-Mouthon	Metabolism (1996) 45:1483-1500
57	Ag1092Trp	Hetero	IV	activitat TK afectada	C. Desbois-Mouthon	Metabolism (1996) 45:1483-1500
58	Del 1.3 Kb (out exó 5)	Hetero	I	No binding	A. Okuno	Molecular Diabetology (1991) 2: 135-138)
58	Leu87Pro	Hetero	III	dism. afinitat insulina	J. Nakae	J Biol Chem (1995) 270: 22017-22022
59	Ser323Leu	Homo	III	Dism. Binding	A. Krook	Diabetes (1994) 43:357-368
60	Arg1351Gln	Hetero	?	?	A. Krook	Diabetes (1994) 43:357-368
61	Asp59Gly	Hetero	III	Dism. binding	M. Rouard	Biochem & Biophys Res Com (1197) 234: 764-768
61	Leu62Pro	Hetero	III	Dism. binding	M. Rouard	Biochem & Biophys Res Com (1197) 234: 764-768
62	Del. exó 2	Hetero	III	Dism. binding	W. Moritz	European Journal of Endocrinology (1996) 135: 357-63
62	Phe996Ile	Hetero	IV	Dism. activitat TK	W. Moritz	European Journal of Endocrinology (1996) 135: 357-63
63	Asp707Ala	Homo	III	no binding	L.M. T Hart	J Biol Chem (1996) 271:18719-18724
64	Lys1068Glu	Hetero	IV	afecta activitat TK	S. O'Rahilly	Diabetes (1991) 40:777-782
64	Val985Met	Hetero	0	no afectació	S. O'Rahilly	Diabetes (1991) 40:777-782
65	Arg1092Gln	Homo	IV	afecta activitat TK	Y. Takahashi	Diabetologia (1997) 40: 412-420
66	Arg993Gln	Hetero	IV	afecta activitat TK	J. Kisari	J Biol Chem (1991) 266:5260-7
66	Arg1000STOP	Hetero	IV	afecta activitat TK	J. Kisari	J Biol Chem (1991) 266:5260-7
67	Arg1131Trp	Hetero	IV	afecta activitat TK	J.D. Medh	Abstract
68	Arg1164Gln	Hetero	V	Acceleració degradació	S. Cocozza	Diabetes (1992) 41: 521-6
69	Del. Lys121	Homo	IV	afecta activitat TK	N. Jospe	J Clin Endocrinol Metab (1994) 79: 1294-1302
70	Ala1134Thr	Hetero	IV	afecta activitat TK	D.E. Moller	J Biol Chem (1990) 265:14979-14985
71	Trp1200Ser	Hetero	IV	afecta activitat TK	D.E. Moller	Molecular Endocrinology (1990) 4: 1183-1191
72	Thr831Ala	Hetero			M. Kan	Diabetes (1995) 44:1081-1086
73	Tyr1334Cys	Hetero	IV	afecta activitat TK	M Kan	Diabetes (1995) 44:1081-1086
74	Arg1131Gln	Hetero	IV	afecta activitat TK	M. Kishimoto	J Biol Chem (1994) 269:11349-1355
75	Met1153Ile	Hetero	IV/V	afecta TK / endocitosi	A. Cama	J Endocrin and Metab. (1991) 73: 894-901
76	Ala1135Glu	Hetero	III / IV	afecta proteolisi / TK	A. Cama	J Biol Chem (1993) 268: 8060-9
77	G-A 5'Intró 17	Hetero	I / IV	Afecta activitat TK	P. Vorwerk	Hormone Research (1999) 52: 211-220
77	Arg1174Gln	Hetero	IV	Afecta activitat TK	P. Vorwerk	Hormone Research (1999) 52: 211-220

2.7.- AGENTS ANTIDIABÈTICS

Es creu que la hiperglicèmia en la Diabetis Tipus 2 és deguda a la inactivació de l'acció de la insulina degut principalment a dues classes de factors; els genètics i els ambientals. Aquesta inactivació dóna lloc a problemes metabòlics com són la superproducció de glucosa hepàtica, la disminució de la secreció d'insulina i la resistència perifèrica a la insulina (73).

S'han emprat diferents compostos com a drogues antidiabètiques, com són les Sulfonilurees (milloren la funció de la cèl·lula i redueixen la glucosa en plasma), les Tiazolidinediones (troglitazona) (incrementen la sensibilitat i la resposta a la insulina) i les Biguanides (Metformina).

2.7.1.- LA METFORMINA

La història de les biguanides comença amb l'ús de la *Galea Officinalis* a l'edat mitjana com a tractament per la diabetis. El component actiu, la guanidina, va ser utilitzat als anys 20 per sintetitzar diferents compostos antidiabètics. Un d'ells, la Metformina, s'està emprant ara en més de 90 països i és un dels agents antidiabètics més utilitzats (74) (**figura 8**).

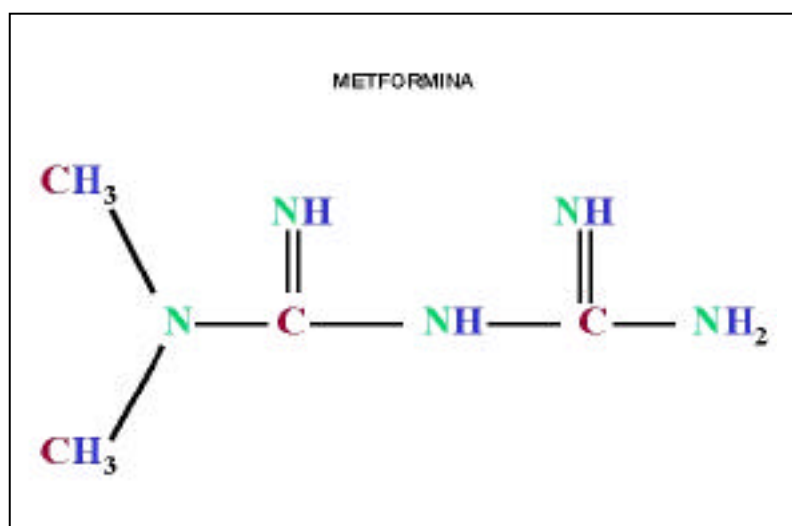


Figura 8.- Esquema de la biguanida Metformina.

La Metformina exerceix diferents efectes beneficiosos en la via metabòlica de la glucosa (75). A nivell del receptor de la insulina, s'ha considerat que la Metformina no té cap efecte en la unió de la insulina, en canvi incrementa tots els efectes biològics que són estimulats per la insulina (transport de glucosa, síntesi de glicogen, metabolisme lipídic, etc). En pacients diabètics i en obesos, s'ha descrit un increment de la

fosforilació del receptor i de l'activitat tirosina quinasa. Es creu, doncs, que la Metformina actuaria després de la unió de la insulina pel receptor i abans de l'activació dels IRSs (75).

El nostre grup va tractar amb la Metformina una pacient afectada de la síndrome genètica de resistència a la insulina Tipus A. Aquesta pacient és heterozigota per una mutació en el domini tirosina quinasa del receptor d'insulina (76). El tractament amb Metformina va normalitzar els nivells d'andrògens i d'insulina, es van establir els cicles menstruals i va aparèixer la telàrquia (77). El mecanisme mitjançant el qual aquest compost ha exercit aquest efecte és un dels punts d'estudi d'aquest treball.